

東京電機大学

博士論文

コマツナ栽培土壌の微生物叢解析及びそれより単離した新種微生物
skT53 株の特性

Analysis of microbial flora in soil cultivated with Komatsuna and
characteristics of a new strain of microorganism, skT53, isolated
from the soil

2022 年 3 月

氏名 小西 智之

目次

第1章序論	1
1.1 背景	1
1.1.1 植物の生育に必要な栄養素について	1
1.1.2 微生物の土壌中での役割	2
1.1.2.1 窒素循環	3
1.1.2.2 リン循環	5
1.1.2.3 土壌病害	6
1.1.2.3.1 糸状菌	7
1.1.2.3.2 細菌	7
1.1.2.3.3 ウイルス	7
1.1.2.3.4 連作障害	8
1.1.3 分子系統解析に基づく分類	9
1.1.4 細菌の同定	10
1.2 目的	10
第2章土壌の微生物叢解析と土壌の栄養の関係	12
2.1 序言	12
2.2 使用試薬・土壌サンプル	12
2.2.1 使用試薬	12
2.2.2 土壌サンプル	13
2.3 実験操作	14
2.3.1 次世代シーケンサを用いた土壌微生物叢解析	14
2.3.2 土壌中の栄養	15
2.3.2.1 リンの測定	15
2.3.2.1.1 可給態リン酸の測定	15
2.3.2.1.2 リン酸吸収係数の測定	15
2.3.2.2 無機態窒素の測定	16
2.3.2.2.1 硝酸態窒素の測定	16
2.3.2.2.2 アンモニア態窒素の測定	17
2.4 結果及び考察	19
2.4.1 次世代シーケンサを用いた土壌微生物叢解析	19
2.4.2 土壌中の栄養	22
2.4.2.1 リンの測定	22
2.4.2.2 無機態窒素の測定	25
2.5 まとめ	28
第3章コマツナ栽培土壌からの微生物の単離	31
3.1 序言	31

3.2 使用培地	31
3.3 実験操作	31
3.3.1 単離及び微生物種の同定	31
3.4 結果および考察	33
第4章 単離した skT53 株の特性	37
4.1 序言	37
4.1.1 <i>Alicyclobacillaceae</i> 科について	37
4.1.2 目的	37
4.2 使用培地	37
4.3 実験操作	38
4.3.1 分子系統解析	38
4.3.2 最適な培地の検討	39
4.3.3 形態学的な特徴の観察及び生理・生化学的性状の試験	39
4.3.4 嫌気条件下の生育	39
4.3.5 至適温度、至適 pH	39
4.3.6 API50CH を用いた炭水化物代謝試験	40
4.3.7 炭素源の資化性試験	40
4.3.8 酵素活性試験	41
4.3.9 脂肪酸およびキノン分析	42
4.3.10 全ゲノム配列解析、G+C 含量	42
4.3.10.1 コンセンサス系統樹の作成	42
4.3.10.2 Average Nucleotide Identity (ANI) 法を用いた菌の同定	42
4.3.10.3 Digital DNA-DNA Hybridization(dDDH)法を用いた菌の同定	43
4.3.11 skT53 株を接種した土壌でのコマツナ生育試験	43
4.4 結果及び考察	44
4.4.1 分子系統解析	44
4.4.2 最適な培地の検討	48
4.4.3 形態学的な特徴の観察及び生理・生化学的性状の試験	48
4.4.4 嫌気条件下の生育	49
4.4.5 至適温度、至適 pH	49
4.4.6 API50CH を用いた炭水化物代謝試験	51
4.4.7 炭素源の資化性試験	52
4.4.8 酵素活性試験	53
4.4.9 脂肪酸およびキノン分析	54
4.4.10 全ゲノム配列解析、G+C 含量	55
4.4.10.1 コンセンサス系統樹の作成	56
4.4.10.2 ANI 法及び dDDH 法を用いた菌の同定	58

4.4.11 skT53 株を接種した土壌でのコマツナ生育試験	58
4.5 まとめ	61
第5章 結論	63
第6章 参考文献	65
第7章 謝辞	69

第1章序論

1.1. 背景

1.1.1. 植物の生育に必要な栄養素について

植物の生育に必要な要素は必須元素（要素）と呼ばれ、その種類は 17 種ある。植物はこれらの元素を栄養素として、空気・水・土などから細胞内に取り込みを行っている。植物の生育において多量に必要とされる栄養素は多量必須元素と呼ばれる。また、微量のものは微量必須元素と呼ばれ、必要量は微量でも不足すると生育に影響を及ぼす。植物の生育に必要な 17 種の元素は以下の通りである（表 1-1）。

表 1-1. 17 種の必須元素

多量必須元素 (9 元素)	炭素 (C)、酸素 (O)、カリウム (K)、水素 (H)、窒素 (N)、リン (P)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、硫黄 (S)
微量必須元素 (8 元素)	鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ホウ素 (B)、塩素 (Cl)、モリブデン (Mo)、ニッケル (Ni)

植物の生育に必要なもので肥料として重要な元素は、窒素、リン、カリウムであり、これらは肥料の三要素と呼ばれている。さらにカルシウムを加えて四要素という場合がある。下の表にそれぞれの要素の特徴をまとめた（表 1-2）。（Brian et al., 2004; Broadley and White 2005; Epstein and Bloom 2005; Kathpalia and Bhatla 2018）

表 1-2. 肥料の四要素の特徴

要素	特徴
窒素 (N)	<ul style="list-style-type: none">植物の葉や茎の成長を促し、収量に大きく影響する。タンパク質、アミノ酸、葉緑体、酵素といった重要な働きをしている化合物の構成成分である。
リン (P)	<ul style="list-style-type: none">核酸やリン脂質として原形質の重要な構成元素である。糖リン酸エステルや ATP の成分であり、光合成やエネルギー代謝および代謝制御に重要な役割を担っている。
カリウム (K)	<ul style="list-style-type: none">生体内でイオンの形態で存在し、細胞の浸透圧調節や pH 安定化に重要な役割を担っている。
カルシウム (Ca)	<ul style="list-style-type: none">細胞壁の構造維持と機能に関わっている細胞壁に結合しているため植物体内での移動性が低く、その欠乏症状は新しい組織から現れる。

現在の農業において多くの場合、単一の作物が栽培されている。作物の栽培が行われている多くの土壌では微量必須元素の供給は十分であるが、多量必須元素は生産量が大きくなると物質循環による供給では不足するため、肥料による供給が必要となる。作物が必要とする

栄養素を、適切な時期や位置に量をバランス良く適切な肥料を与えることが大事である。

土壌に用いる肥料は、化学的に処理をされた無機質肥料の化学肥料と生物由来の有機物質から作られた有機質肥料に区分される。化学肥料は肥料の三要素の 1 種類のみ単肥と単肥を 2 種類以上の含む複合肥料に分けられ、有機質肥料には菜種油や大豆油などの食品製造の副産物から作られる植物質肥料、魚かすや家畜由来の骨粉、肉かす粉末から作られる動物質肥料、牛糞、鶏糞を主原料とした特殊肥料と多くの種類がある。化学肥料の特徴は安価かつ効果の速効性があげられる、一方、有機質肥料の特徴は高価だが効果の持続性があげられる。

作物の収量は 17 種の必須元素のなかで最も不足している元素に左右される。また、光、温度、水分などの環境要素にも影響を受ける。肥料を施肥すればするほど収量が上がるということではなく、ある程度の収量で頭打ちとなる。どの元素が不足しているもしくは過剰に存在しているかを判断し適切な肥料を施肥するために土壌診断を行う必要がある。土壌診断では、土壌の容積重、pH、EC（電気伝導度）、陽イオン交換容量、塩基バランス、可給態養分量、リン酸吸収係数などの土壌の基本的性質を分析測定する。

植物は生育に必要な要素のうち、光と二酸化炭素や酸素は葉から、他の栄養と水は土壌の根から吸収する。植物の生育に必要な窒素、リン、カリウムの植物への取り込みについては、窒素では窒素固定菌などの微生物が関与し、リンでは菌根菌などの微生物が関与し、カリウムではイオンが関与している。すなわち栄養の取り込みには土壌微生物が強く関わっている。

1.1.2. 微生物の土壌中での役割

植物は光合成によって酸素を生産し、根からリン、窒素、カリウムなどの無機元素を吸収して植物自身の体を作っている。多くの動物は植物によって作られた酸素を呼吸し使い、植物などの有機物を摂取することで活動に必要なエネルギーと細胞成分を作るのに必要な栄養を獲得している。植物や動物の遺骸は長い時間をかけて土へと還る。詳しく言えば、遺骸は土壌中のミミズや昆虫、微生物によって無機物に分解され、土壌中の無機元素へと還元される。このように、生物が生きるために必要な元素は、大気、陸地、海の間を植物、動物、微生物を通して循環しており、これは物質循環と呼ばれ、物質循環のメインは土壌であると考えられている。

土壌には 1 g あたり 10^{10} ~ 10^{11} 個と言われる膨大な数の多種多様な微生物が存在している。微生物は原核生物と真核生物に分かれている。原核生物には真正細菌と古細菌が分類され、真核生物には藻類、菌類、原生生物などが分類されている。多くの微生物は動物や植物の遺骸などの有機物を栄養源として分解し様々な物質を変化させる分解者としての役割を持っている。微生物は一般に、こうした物質変化によって自らは分裂し増殖する。微生物の増殖には有機物が必要とされる。有機物は微生物体内で化学変化し、新たな合成の材料となる（同化）か、化学変化で生ずるエネルギーを ATP 分子に移し、生存と増殖に必要なエネルギー（異化）となる。このように土壌の微生物は自然界の物質循環に大きく関わっている。なお、土壌中の微生物は分解者としての役割の一方、植物に対して被害をもたらす病原を有している。

1.1.2.1. 窒素循環

大気の約 80%は窒素が占めている。この窒素はそのままでは窒素循環の経路には進んでいかない。窒素循環の大まかな流れは、大気中の窒素が土壌に固定され、固定された窒素ガスが亜硝酸イオン、硝酸イオンを経て（硝化）植物に利用されるというものである。また、硝酸イオンの一部は大気中に窒素ガスを放出する脱窒によって循環する（図 1-1）。以下、窒素固定、硝化、脱窒について詳細に論ずる。

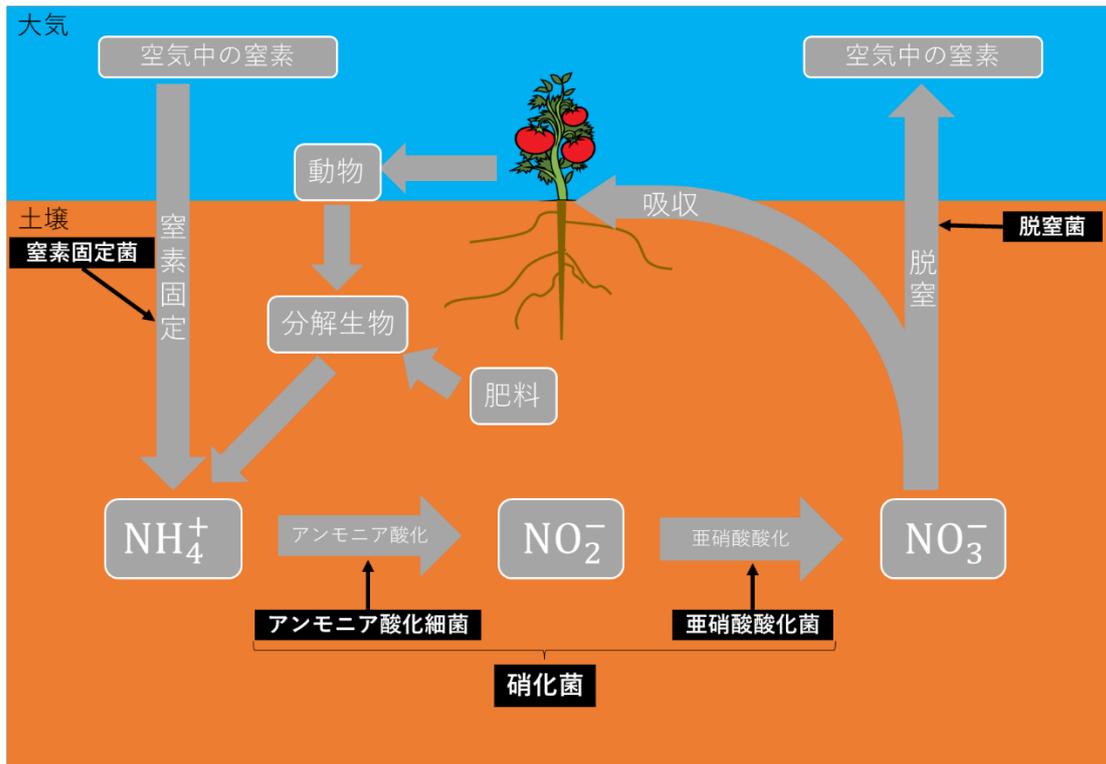
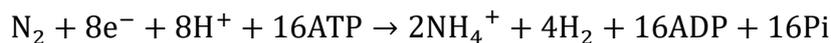


図 1-1. 窒素循環の流れ

① 窒素固定

大気にある窒素ガス (N₂) をアンモニア (NH₄⁺) に還元し、微生物が利用することを窒素固定という。窒素固定反応を行う酵素であるニトロゲナーゼを生産する菌を窒素固定菌という。窒素固定反応はニトロゲナーゼによって触媒され、ATP を用いて一分子の窒素ガスから 2 分子のアンモニアを生成する。



ニトロゲナーゼは酸素感受性であるため、無酸素条件下で反応が進行する。有酸素条件下で窒素固定を行う細菌は、細胞内に無酸素部分をつくり、そこでニトロゲナーゼを働かせ、窒素固定を行っている。窒素固定を行う原核生物は、単生窒素固定菌、協調的窒素固定菌、共生窒素固定菌に分けられる。代表的な窒素固定微生物について表 1-3 にまとめた。(日本土壤微生物学会, 1997, 2000; 服部勉, 2008) 以下、単生窒素固定菌、協調的窒素固定菌につ

いて説明する。

表 1-3. 代表的な窒素固定生物(服部勉, 2008)

単生窒素固定菌	好気性生物	<i>Azotobacter, Beijerinckia</i>	従属栄養菌
		<i>Anabaena, Nostoc</i>	シアノバクテリア
		<i>Alcaligenes, Thiobacillus</i>	化学合成独立栄養菌
	微好気性生物	<i>Azospirillum, Klebsiella</i>	従属栄養菌
	嫌気性生物	<i>Clostridium, Desulfovibrio</i>	従属栄養菌
		<i>Rhodospirillum</i> など	光合成菌
<i>Methanosarcina</i>		メタン生成アーキー	
協調的窒素固定生物	<i>Azospirillum</i>	イネ、小麦などの根圏に生息	
共生窒素固定生物	<i>Rhizobium, Bradyrhizobium</i>	マメ科植物と共生する根粒菌	
	<i>Frankia</i>	ハンノキなどの非マメ科植物と共生	
	<i>Anabaena</i>	蘚苔類やシダ植物のアカウキクサと共生するシアノバクテリア	
	<i>Gluconobacter, Clostridium, Herbaspirillum, Azospirillum</i>	エンドファイト (サトウキビ、イネなどに生息)	
	<i>Treponema</i>	シロアリの腸内に生息	

・単生窒素固定菌

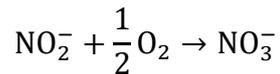
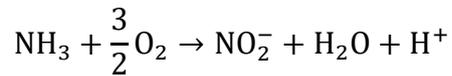
単生窒素固定菌は微生物単独で生存して窒素固定を行う。*Anabaena* などのシアノバクテリア、*Azotobacter*、*Beijerinckia* などの従属栄養菌、*Alcaligenes* や *Thiobacillus* などの独立栄養菌が単生で窒素固定を行う。シアノバクテリアは、ヘテロシストと呼ばれる厚い細胞壁を有する異質細胞を形成する。ニトロゲナーゼ活性が酸素ガスで容易に破壊されるので、いろいろな方法で酸素ガスの害から守る機構を発達させている。

・共生窒素固定菌

植物は微生物から窒素固定産物を受け、微生物は植物からエネルギー源となる有機化合物を受け共生関係にあり、このような微生物は共生窒素固定菌と呼ばれている。マメ科の根粒菌や *Frankia* 属は植物との関係が極めて特異的であり、植物内に共生のための特別な組織を作って窒素固定を行っている。また、植物と根圏の窒素固定菌はゆるい共生関係にあると考えられ、協調的窒素固定菌と呼ばれている。また、植物の根、葉、茎の細胞間隙や導管の内部に生息して窒素固定を行う菌がいる。これらは協調的窒素固定菌と区別するためにエンドファイト窒素固定菌と呼ばれている。(服部勉, 2008; Wani et al., 2013)

② 硝化

NH_4^+ は NO_2^- を経て NO_3^- にまで酸化される。この過程は硝化と呼ばれ、反応を担う細菌は硝化菌と呼ばれる。硝化菌は NH_4^+ を NO_2^- に酸化するアンモニア酸化菌と NO_2^- を NO_3^- に酸化する亜硝酸酸化菌に分けられる。亜硝酸酸化菌のほとんどは通性独立栄養菌である。



③ 脱窒

嫌気条件下で酸素の代わりに NO_2^- や NO_3^- を還元して、 N_2O ガスや N_2 ガスを生成する反応を脱窒作用といい、この脱窒を行う微生物は脱窒菌と呼ばれる。

1.1.2.2. リン循環

植物の生育にとって最も重要な要素の一つであるリンは地球上では種々の無機、有機の形態で存在している。そのうち最も多いのがアパタイトと呼ばれる主としてカルシウム塩の無機態リンである。リン酸肥料の多くはアパタイトを主成分とするリン鉱石から作られる。土壌中の無機リンは、鉄、アルミニウム、カルシウム等と結合しており、難溶性である。土壌微生物や植物の根は、二酸化炭素や有機酸の生産を通して無機リンを可溶化する。リン循環の流れは図 1-2 のようになっている。

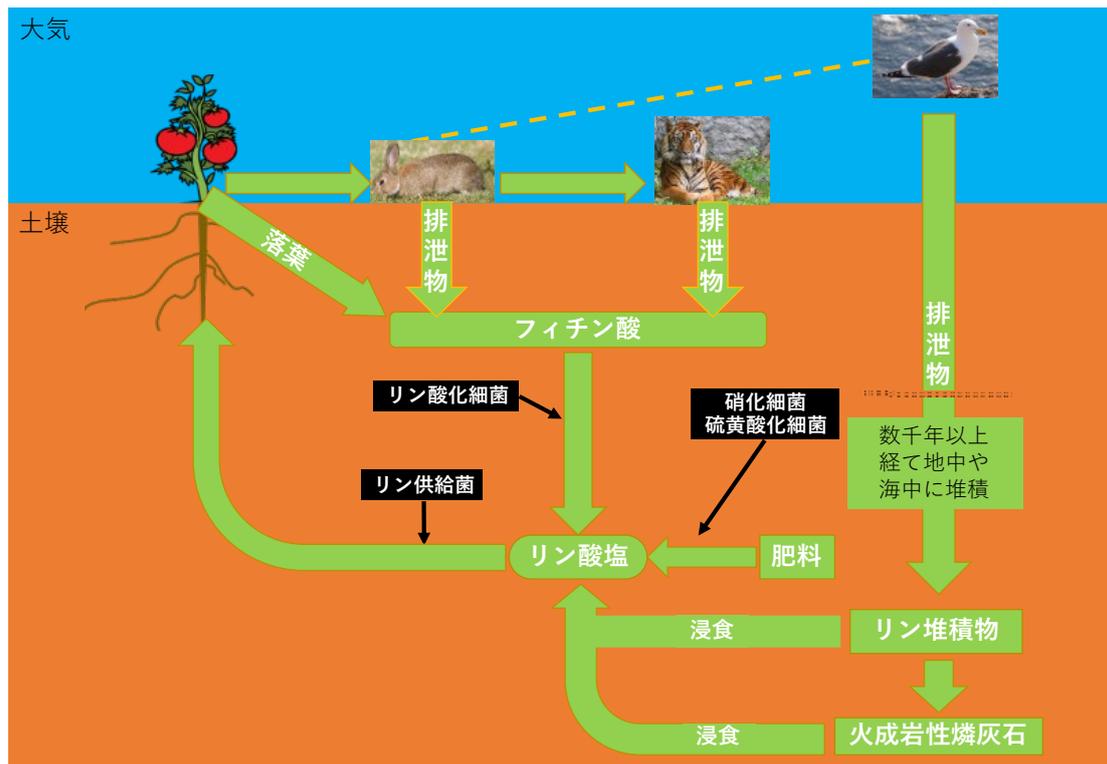


図 1-2: リン循環の流れ

土の中の有機態リンには、フィチン、リン脂質、核酸などがある。フィチンはイノシトール-6-リン酸エステル $\text{Ca} \cdot \text{Mg}$ 塩で、植物のリン酸貯蔵物質である。土壌中では多くの土壌微生物や植物が作るエステラーゼにより分解され、リン酸が遊離してくる。

リン酸の取り込みには菌根菌と呼ばれる糸状菌が関わっている。菌根菌は、健全な植物の根にも糸状菌が感染していることが発見され、19 世紀に菌根という名前が付けられた。植物が地上に進出して以来、植物と菌根菌は共進化を遂げ、その結果、大多数の植物が菌根を形成する。

菌根は植物の根をさらに土壌中に張り巡らす効果をもたらし、植物が土からのリン酸、窒素などの栄養素や水分を吸収するのを助ける。リン酸の吸収効果は大きい。多くの場合、菌根菌は植物から炭素化合物を供給される。栄養の乏しい土壌条件下での植物の生育は菌根によって助けられる。一方、豊富な栄養条件下では菌根の菌種は植物に対して寄生的になる。

共生のメカニズムに関しては、培養困難な菌が多いこと、菌、植物ともに種類が多く、宿主特異性も複雑であるため、研究が進んでおらず、不明な点が多い。(日本土壌微生物学会, 1997; 服部勉, 2008)

1.1.2.3. 土壌病害

糸状菌、細菌、ウイルス等によって引き起こされる病気は、農業生産に深刻な被害をもたらす。病原性微生物は風や水、昆虫により空中を伝播して植物の地上部に感染する場合と、土壌中に存在して植物の根やその他の地上部に感染する場合がある。両者の間に病気そのものについての違いはないが、病原性微生物は宿主がいない条件下でも土の中で腐生的な生活

を送り、あるいは耐久体を作って長期間生存できる。そして宿主の根が接近すると、根から分泌される糖やアミノ酸などの栄養物に刺激され、賦活化し、活動を開始する。したがって、感染がおこるためには、病原菌が土壌中に存在することが前提であり、地上部の病気のように病原菌が長い距離を移動して大発生するようなことはない。しかし一度発生すると、病原菌が土壌中に存在するため、防除は困難である。土壌病害は細菌、ウイルス、糸状菌によって引き起こされるが、なかでも糸状菌によるものが最も多い。

1.1.2.3.1. 糸状菌

土壌伝染病の菌類の生活様式は、腐生能力と寄生能力の強さから、分化寄生菌と未分化寄生菌に分けられる。分化寄生菌は絶対寄生菌、または条件によっては腐生生活も行う条件的腐生菌と呼ばれ、寄生性が著しく分化して宿主特異性が高く、逆に腐生能力は全く欠くか、極めて弱い。未分化寄生菌は条件的寄生菌とも呼ばれ、腐生能力は強く、他の微生物と競合して有機物を分解して増殖できるが、寄生性の発達・分化は不十分である。したがって寄生できるのは、抵抗性が弱かったり、ストレスで弱った植物であり、寄生する範囲は広い。病原性の糸状菌の代表としては、*Rhizoctonia solani* や *Pythium spp.* がある。

1.1.2.3.2. 細菌

土壌病害を引き起こす細菌は、*Erwinia*、*Ralstonia*、*Pseudomonas*、*Agrobacterium* 等に限られる。*Ralstonia solanacearum* (以前は *Pseudomonas*) は青枯れ病を引き起す。トマト、ピーマンなどのナス科植物のほか、バラ科、マメ科等の多くの植物に感染し、発病させる。*Erwinia cartovora subsp. Cartovora* は、白菜、キャベツ、玉ねぎなどの野菜や、花卉に軟腐病を引き起こす。現在、判明している細菌が原因の病気の一例を表 1-4 にまとめた。(服部勉, 2008)

表 1-4. 細菌が引き起こす病気

病気名	病原菌
青枯病	<i>Ralstonia</i> 属
軟腐病	<i>Pectobacterium</i> 属
根頭がんしゅ病	<i>Agrobacterium</i> 属
苗立枯病	<i>Rhizoctonia</i> 属、 <i>Pythium</i> 属、 <i>Fusarium</i> 属、 <i>Phytophthora</i> 属
根腐病害	<i>Thanatephorus cucumeris</i> 属

1.1.2.3.3. ウイルス

土壌伝染性ウイルスは主として線虫や菌類により媒介されるが、タバコモザイクウイルス等は媒介生物なしに伝搬される。土壌伝染性ウイルスの一例を表 1-5 にまとめた (津田, 2006)。

表 1-5. 土壌伝染性植物ウイルス一覧

ウイルス属名	ウイルス種名	媒介方法
<i>Tobamovirus</i>	タバコモザイクウイルス	接触伝搬
	トマトモザイクウイルス	接触伝搬
	トウガラシマイルドモットルウイルス	接触伝搬
	キュウリ緑斑モザイクウイルス	接触伝搬
<i>Carmovirus</i>	メロンえそ斑点ウイルス	土壌菌伝搬
<i>Carmovirus</i>	エンドウ茎えそウイルス	土壌菌伝搬
<i>Necrovirus</i>	トルコギキョウえそウイルス	土壌菌伝搬
<i>Necrovirus</i>	タバコネクロシスウイルス	土壌菌伝搬
<i>Ophiovirus</i>	ミラフィオリレタスビッグベインウイルス	土壌菌伝搬
	チューリップ微斑モザイクウイルス	土壌菌伝搬
	<i>Lettuce ring necrosis virus</i>	土壌菌伝搬
所属未定	チューリップ条斑ウイルス	土壌菌伝搬
<i>Varicosavirus</i>	レタスビッグベイン随伴ウイルス (タバコ矮化ウイルス)	土壌菌伝搬
<i>Bymovirus</i>	オオムギマイルドモザイクウイルス	土壌菌伝搬
	オオムギ縞萎縮ウイルス	土壌菌伝搬
	イネえそモザイクウイルス	土壌菌伝搬
	コムギ縞萎縮ウイルス	土壌菌伝搬
<i>Furovirus</i>	ムギ類萎縮ウイルス	土壌菌伝搬
<i>Benyvirus</i>	ビートえそ性葉脈黄化ウイルス	土壌菌伝搬
	<i>Beat soil-borne mosaic virus</i>	土壌菌伝搬
<i>Pomovirus</i>	ジャガイモモップトップウイルス	土壌菌伝搬

1.1.2.3.4. 連作障害

連作障害とは、同じ作物を同じ畑に毎年作付けする連作が、作物の生育に悪影響を及ぼし（例えば、病虫害にかかりやすくなるなど）、作物の収量や品質を低下させることであり、昔から知られていた。江戸時代には「いや地」と呼ばれていたが、現在では、連作による害を「連作障害」と呼ぶ。近年では作物の生産効率を上げるために生産地の集団化や施設の大規模化が進み、その結果商品性の高い作物が連作されることが多くなり、重大な問題となっている。

同じ作物が連作されると、土壌微生物相の多様性の低下や単純化により生態系が不安定化し、特定作物の根に侵入できる菌がその根で増殖し、残根上で生き残り、新しい根に感染して増殖…、というサイクルを繰り返して病原菌が集積する。特に野菜の栽培期間が普通の畑作物に比べて短く、年に2~3回連作されることも珍しくはないため、障害は重大化しやすい。

連作障害の主な原因としては、①土壌の理化学性の悪化による生理障害、②土壌中の微生物多様性の減少による、病原菌に対する静菌力の減少、③植物由来の毒素による害、などが挙げられる。

1.1.3. 分子系統解析に基づく分類

分子系統解析に基づく分類は遺伝子の違いに着目して分類する方法である。生物は種ごとに塩基配列やアミノ酸配列が異なる。この違いは、共通の祖先から種が分かれ増えていくが、その経過時間が長ければ長いほど違いはより大きくなる。種が分かれた順番や経過時間を推定すれば、系統樹を描くことができる。分子系統解析は、塩基配列やアミノ酸配列を使い、生物間や遺伝子の進化的系統を系統樹を用いて解析することである。従来の系統による分類では、形や性質となって現れている表現型を解析していたが、環境の影響で似通った形態や生態に進化もしくは変異を起こしやすく、正しい関係を明らかにしにくい。そこで、環境の影響を受けない塩基配列を直接解析する方法が望まれていた。そして、現在、技術の進歩によって塩基配列の読取りと大量のデータ解析が容易になった。分子系統解析によって描かれる系統樹は塩基配列という単一の情報源を基に、様々な算出方法によって描き出されるものであるため、解析する生物数や解析領域を増やすことにより正しい系統関係に収束すると考えられる。

系統樹を作成する方法には距離に基づく距離行列法と形質に基づいた形質状態法がある。距離行列法では、2本の配列の比較により距離行列を計算し、系統樹に変換する。形質状態法では、各サイトにおけるすべての生物種で確認される塩基やアミノ酸といった形質を一つの系統樹に変換する。距離行列法は形質状態法より計算が早いことが多く、2者間の距離が計算できれば、異なる種類のデータの解析にも適用できる。距離行列法にはUPGMA法や近隣結合法 (neighbor-joining; NJ法, Saitou et al., 1987) がある。形質状態法には、最大節約法 (maximum-parsimony; MP法, Fitch 1971) や最尤法

(maximum-likelihood; ML法, Felsenstein 1981)、ベイズ法がある。UPGMA法は同じ速度で進化すると仮定し、距離の算術平均の小さなものから結合することにより得られる樹形を選択する。最も計算の容易で簡単な方法であるが深化速度が異なった場合誤った推定を行ってしまう。NJ法は同じ速度で進化しないと仮定し計算の各段階で全ての枝の長さの合計が最小の樹形を選択する。MP法は、考えられる全ての系統樹から形質変化の数が最も少ないものを選択し作成する方法である。ML法は、想定される樹形ごとに配列が得られる尤度 (与えられた配列データが得られる確率) を求め、最も尤度の高い樹形を選択する。ベイズ法はベイズの事後確率が最大となるような樹形を選択する。このように系統樹を作成する算出方法は様々なものがあり、それぞれの特徴があるが条件を満たさずに系統樹を作成してしまうと信頼性の低いものになってしまう。

系統樹の信頼性の評価にはブートストラップ値が用いられる。ブートストラップ値は、以下のように算出される。作成した系統樹で使った n 個の塩基配列を比較したとき、 n 回の復元抽出法により n 個からなる仮想データを作成する。この操作を 100~1000 回繰り返し、それぞれの仮想データから系統樹を再構築する。再構築した系統樹で特定の系統関

係が再現できる確率をブートストラップ値と言ひ、その値は 0~100 の値で示され、100 に近いほど信頼性が高い。

1.1.4. 細菌の同定

微生物の分類・同定は、単離株に対して様々な試験を行い株の持つ特徴を明らかにすることで可能となる。分類するための方法は、形態学的な特徴の観察、生理・生化学的性状の試験、細胞成分の化学分析や遺伝子の解析といったものがある。形態学的な特徴の観察では、目視や実体顕微鏡による固体培地上での形態の観察、あるいは光学顕微鏡によるグラム陽性・陰性を判断できるグラム染色や芽胞染色などの染色の観察を行い分類する。生理・生化学的性状の試験では、糖から酸への生産性を試験する O-F テストや生育できる pH や温度の範囲の試験、利用できる炭素源の種類、カタラーゼ活性、オキシダーゼ活性などの試験を行い分類する。細胞成分の化学分析では、細胞壁のペプチドのアミノ酸とジアミノ酸の種類解析やユビキノン、メナキノンの種類の解析、GC 含量の解析を行い分類する。遺伝子の解析では、16S rRNA 遺伝子塩基配列を利用することで相同性による属や種の分類ができる。種は 1987 年の国際微生物命名委員会の特別委員会で「DNA-DNA ハイブリッド形成試験において 70%以上の類似度を示し、 ΔT_m 値が 5°C以下の幅に入る。」となる菌株の集まりと公式に定義した (Wayne et al., 1987)。DNA-DNA ハイブリッド形成試験 (DNA-DNA ハイブリダイゼーション) では、単離株と種を代表する基準株との相同値を用いて新種か同種か判定する指標が得られる。

1.2. 目的

70 億人を超えて急増する世界人口と途上国の経済発展によって食糧需要の拡大は続いている。それらを賄うには農業技術の進歩が欠かせない。これまでは緑の革命に象徴されるような近代農業は多量の化学肥料や化学農薬の使用、栽培体系に適した作物の品種改良により高い生産性を達成してきた。しかし、こうした近代農業は物質循環や生物多様性に変調をきたし、農業の持続性という意味において問題があると指摘されている。持続可能な農業の技術として微生物の分野が注目されている。農作物と微生物の相互作用に関する研究開発と農業への適用は 19 世紀半ばの植物病原菌研究にはじまり、20 世紀前半にかけては根粒菌や菌根菌に代表される植物に有用な微生物の基礎研究が行われてきた。1950 年代以降、有用な微生物の研究は実用段階に入り、微生物を用いた生物農薬や微生物資材の販売が行われてきた。微生物農薬はもともと自然界に存在しているものが多く、これらを活用した植物病害の防除は、化学農薬で近年問題となっている薬剤耐性病原菌の出現や農薬残留の問題等を解決するための有力な手段として注目されている。また微生物資材は連作障害の防止や作物の生産性や品質向上などで注目されている。このように、作物の品種改良や水耕栽培などの農業技術の発展に加え、微生物研究は農業技術の進歩に極めて重要である。

植物の生育に必要な 17 種の栄養素のうち窒素、リンなどは土壌中の微生物を介して植物に吸収されている。土壌中には植物成長促進 (PGP) に欠かせない役割を持つ窒素固定菌や菌根菌などの植物成長促進細菌 (PGPB) が存在する一方、立枯病などといった植物を病気にす

る病原菌が存在する。

本研究では足立区内の協力農家の畑から採取した土壌中の微生物叢の解析と栄養素の測定からコマツナ栽培土壌で発生した生育不良の微生物叢と土壌中栄養素の関係及び土壌消毒が微生物叢に与える影響を考察すると共に生育不良土壌からの微生物の単離を行い、作物の生育へ影響を与える有用な微生物の発見を目的とした。

第2章 土壌の微生物叢と土壌中栄養との関係

2.1. 序言

農作物は発芽から収穫までの過程で膨大な数の微生物叢と相互作用する。土壌には1 gあたり 10^{10} ~ 10^{11} 個といわれる膨大な数の多種多様な微生物が存在し、根圏では非根圏より多く存在すると言われている。根圏に存在し植物と相互作用して有益な効果をもたらす微生物については基礎・応用研究が行われてきた。だが、次世代シーケンサによるメタゲノム解析の発展と普及により従来の培養法では微生物叢全体の1%程度しか把握・分離されていないことが明らかになった。今まで植物と相互作用する可能性のある微生物の種類の関係は大幅に少なかったと考えられ、分離培養されていない微生物の中に植物にとって有益な効果をもたらす微生物が多数存在すると思われる。

本章では足立区内の3つの協力農家の畑から採取した土壌中の微生物叢の解析と栄養素の測定からコマツナ栽培土壌で発生した生育不良の微生物叢と土壌中栄養素の関係及び土壌消毒が微生物叢に与える影響を考察した。

2.2. 使用試薬・土壌サンプル

本章で使用した試薬と土壌のサンプルについて以下に示した。

2.2.1. 使用試薬

抽出用硫酸液 (0.002N- H_2SO_4)

3.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 N 硫酸 2 mL 加え定容

モリブデン酸アンモニウム液 (A 液)

40 g/L $(NH_4)_5Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

アスコルビン酸液 (B 液)

特級 L-アスコルビン酸 1.1 g を水に溶かして 60 mL に定容

酒石酸アンチモニルカリウム液 (C 液)

2.7 g/L 酒石酸アンチモニルカリウム

混合発色試薬

100 mL 5N 硫酸, 30 mL A 液, 60 mL B 液, 10 mL C 液

リン酸標準液 (P_2O_5 1000ppm 溶液)

0.1917 g /L KH_2PO_4

浸出液 (2.5%リン酸アンモニウム溶液) pH 7.0

25 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, H_3PO_4

硝酸 (A 液)

濃硝酸 (HNO_3) を純粋で 1 : 1 で混和

メタバナジン酸アンモニウム液 (B 液)

2.5 g/L NH_4VO_3

モリブデン酸アンモニウム液 (C 液)

50 g/L $(NH_4)_5Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

発色試薬（バナドモリブデン溶液）

A液：B液：C液=1：1：1の割合で混和

リン酸標準液（P₂O₅ 2000ppm 溶液）

3.8332 g/L KH₂PO₄

硝酸態窒素標準液（NO₃-N 1000 ppm）

7.2185 g/L KNO₃

アンモニア標準液（NH₄-N 1000 ppm）

4.717 g/L (NH₄)₂SO₄

2.2.2. 土壌サンプル

協力農家の土壌を、農林水産省から出ている「土壌・作物栄養診断マニュアル」（藤田ら, 2015）を参考にして次のように行った。表面 1 cm 程度を除去し表面から約 10 cm 部分まで採取した。採取した土壌の状態などについて表 2-1 に示した。

表 2-1. 土壌サンプル

No.	採取日	栽培場所	状態	農作物	備考
1	2014/11/15	南ハウス 2	収穫後	コマツナ	
2	2014/11/15	北ハウス 3	収穫後	コマツナ	生育不良
3	2014/12/26	北ハウス 3	消毒後		土壌消毒後
4	2015/2/9	北ハウス 3	作付け前		
5	2015/10/27	北ハウス 3	収穫後	水菜	土壌消毒後 8 ヶ月経過
6	2015/12/3	北ハウス 3	栽培中	コマツナ	土壌消毒後 1 年経過
7	2016/7/22	北ハウス 3	作付け前	ナス(苗木)	土壌消毒後 2 年経過

2.3. 実験操作

2.3.1. 次世代シーケンサを用いた土壌微生物叢解析

次世代シーケンサはサングーシーケンスと背景にある概念は共通している。どちらも伸長している DNA 鋳型に DNA ポリメラーゼにより蛍光色素を標識したジデオキシヌクレオチド (ddNTP) を付加し蛍光によって塩基を同定する。ヒトゲノムプロジェクトの最終段階に当たる 2000 年代初頭には技術的に成熟し、電気泳動・蛍光検出・塩基同定までを自動化したシーケンサが稼働していた。一般的なシーケンスでは、1 度に 1 つの DNA 断片をシーケンスすることしかできないが、次世代シーケンサでは何百万の DNA 断片を大量に並列シーケンスできる。様々な技術的特長を持つ機器が各企業から開発されている。共通の方法として、鋳型となる DNA を適当な長さに断片化した後に、アダプター配列を利用して増幅かライゲーションしたライブラリーが必要となる。このライブラリー断片をハイブリダイズする固体表面上で増幅する。この増幅により単一ライブラリー断片に由来する DNA のクラスター群が形成され、各クラスターが個々のシーケンシング反応で作用する。各クラスター配列は蛍光シグナルを介して視覚的に読み取られる。データとして、各クラスターで読み取られた DNA 配列を集めた生データが出力される。このデータを解析することで様々な結果を読み取れる。

コマツナ栽培土壌で発生した生育不良の症状は、生育が通常よりも長いこと、根や葉に病気などの異常が見られない。また、コマツナなどのアブラナ科の根には菌根菌が寄生しないことから原核生物に注目し、16S rRNA の微生物叢解析を行った。解析は 16S rRNA 遺伝子配列の V4 領域を行った (図 2-1)。土壌のゲノム DNA の抽出と微生物叢解析を以下のように行った。

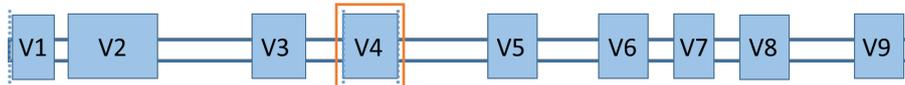


図 2-1. 16S rRNA 遺伝子配列の超可変領域 (V1~V9)

- [1] 採取した土壌は 2 mm のふるいにかけて、根などを取り除いた。
- [2] ふるいにかけて土壌 0.5 g を専用の容器に加えた。
- [3] ISOIL for Beads Beating (株式会社ニッポン・ジーン) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。
- [4] 抽出したゲノム DNA を鋳型にアダプター付プライマーを用いて解析領域を増幅した。使用したアダプター付プライマーの塩基配列を以下に示した。
F :
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
R :
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCT
AAT
- [5] 増幅した DNA は MiSeq (illumina 社) を用いて解析を行った。解析は株式会社ファ

スマックに委託した。

[6] 解析で得られたデータを用いて OTU 数（菌種数）や菌種組成等の分析を行った。

2.3.2. 土壌中の栄養

2.3.2.1. リンの測定

2.3.2.1.1. 可給態リン酸の測定

活性のアルミナや鉄が多くなると土壌の酸性が強まり、リン酸はこれらと結合して不溶性の形に変わり、可給態リン酸が減少する。pH が中性に近いとリン酸は石灰と多く結合し、これは比較的作物に吸収利用されやすい。日本は火山灰土壌が広く分布しており、また降雨量も多いため土壌が酸性になりやすいため、リン酸欠乏土壌が多い。このことからリン酸肥料が昔から重要視されてきた。可給態リン酸は 30~100 mg/100 g soil 以上が適正值として考えられている。この測定は農林水産省から出ている「土壌・作物栄養診断マニュアル」（藤田ら, 2015）を参考にして以下のように行った。

[1] 風乾土 0.5 g に抽出硫酸液 100 mL を加えた。

[2] 30 分間振盪を行った。

[3] ろ紙（No.6）を用いてろ過を行った。

[4] ろ液 1 mL と混合発色試薬 1.6 mL を混合し蒸留水で 10 mL に定容を行った。

[5] 15 分間静置後、分光光度計で測定（波長=710 nm）。

リン酸標準液（P₂O₅ 1000ppm 溶液）を用いて 0、0.2、0.6、1.0、2.0 mg の測定を行い、検量線を作成した。検量線を用いて P₂O₅ 含量を算出し、土壌 100 g 当たりの可給態リン酸を求めた。可給態リン酸の計算方法は以下の通りである。

土壌 100 g 当たりの可給態リン酸（mg）＝

$$\frac{\text{検量線で求めた P}_2\text{O}_5 \text{ 含量 (mg)} \times 100}{\text{土壌の採取量 (g)} \times \frac{\text{ろ液の採取量 (mL)}}{\text{抽出用硫酸液量 (mL)}}} \times \text{水分係数}$$

$$\text{水分係数} = \frac{100}{100 - \frac{(B - C)}{(B - A)} \times 100} \times 100$$

容器重：A g

容器重＋乾燥前の試料重：B g

容器重＋乾燥後の試料重：C g

2.3.2.1.2. リン酸吸収係数の測定

土壌はリン酸を吸収し、作物が吸収出来ない形に変換する性質をもつ。この作用をリン酸

の固定と呼んでいる。リン酸の固定の仕組みは無機物質との化学的結合、土壌コロイドとの結合、あるいは有機物との結合などの要因が考えられるが、作物を栽培する上で一番問題になるのは化学的結合である。土壌中の活性のアルミナや鉄と結合して不溶性のリン酸アルミニウムやリン酸鉄を作る。リン酸の固定の程度を表すのにリン酸吸収係数という指標が用いられ、土壌 100 g が固定するリン酸 P_2O_5 (mg) をもって表される。例えばリン酸吸収係数 1000 とは 100 g の土壌が 1000 mg の P_2O_5 を固定することを意味する。従って、施肥にあたっては作物が生育するのに必要なリン酸以外にリン酸吸収係数を中和するためのリン酸肥料を余分に施用しなければならない。リン酸吸収係数が 1500 以上の土壌はリン酸を施用しても土壌に吸収されてしまうため、リン酸質肥料を施用するべきと考えられている。測定は農林水産省から出ている「土壌・作物栄養診断マニュアル」(藤田ら, 2015) を参考にして以下のように行った。

<サンプルの測定>

- [1] 風乾土 5 g に浸出液 10 mL を加えた。
- [2] 攪拌振盪後、24 時間静置した。
- [3] ろ紙 (No.6) を用いてろ過を行った。
- [4] ろ液 0.1 mL を 10 mL に定容した。
- [5] [4]の溶液 1 mL と発色試薬 (バナドモリブデン溶液) 4 mL 加え混合した。
- [6] 攪拌し 30 分間静置した。
- [7] 分光光度計で測定を行った (波長 = 420 nm)。

<浸出液の測定>

- [1] 浸出液 0.1 mL を 10 mL に定容した。
- [2] 溶液 0.5 mL と純水 0.5 mL を加え混合した。
- [3] [2]の溶液 1 mL と発色試薬 (バナドモリブデン溶液) 4 mL 加え混合した。
- [4] 攪拌し 30 分間静置した。
- [5] 分光光度計で測定を行った (波長 = 420 nm)。

リン酸標準液 (P_2O_5 2000ppm 溶液) を用いて 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg の測定を行い、検量線を作成した。検量線を用いて P_2O_5 含量を算出し、土壌 100 g 当たりのリン酸吸収係数を求めた。リン酸吸収係数の計算方法は以下の通りである。

土壌 100 g 当たりのリン酸吸収係数 =

$$(\text{浸出液中の } P_2O_5 \text{ (mg)} \times 4000) - (\text{土壌試料浸出液中の } P_2O_5 \text{ (mg)} \times 2000)$$

2.3.2.2. 無機態窒素の測定

2.3.2.2.1. 硝酸態窒素の測定

硝酸態窒素は陰イオンであるため土壌コロイドに吸着されない。水あるいは弱酸塩溶液のどちらでも抽出される。硝酸を大量に施肥すると土壌コロイドに吸着されず、土壌溶液中

の濃度が高くなる。土壌の塩類濃度が作物体内の体液の塩類濃度より濃くなった場合、作物は栄養を吸収出来ず、水分を放出する状態になり、生育不良となり、枯死にすることがある。硝酸態窒素は 3~8 mg /100 g soil が適正值と考えられている。測定は農家のお医者さんキット（富士平工業株式会社）を使用した。以下に詳細を記す。

<農家のお医者さんのキットを用いた抽出液の作製>

- [1] 濾紙（GA-200）をろ過器にセットした。
- [2] 成分抽出試薬を抽出容器の 20 mL 加えた。
- [3] 抽出容器に土壌 1.6 g 加え、ろ過器を抽出容器と結合させた。
- [4] 3 分間振盪を行った。
- [5] 脱気栓を取り、自然ろ過を行った。

<農家のお医者さんのキットを用いた硝酸態窒素の測定>

- [1] ろ液 1 mL を発色用試験官に加えた。
- [2] 検定試薬 A を加え攪拌した。
- [3] 検定試薬 B を試薬さじですりきり一杯加え、すぐにシリコン栓で栓をした。
- [4] 上下に 10 秒激しく振盪し、5 分間静置した。
- [5] 分光光度計で測定を行った（波長=540 nm）。

硝酸態窒素標準液（NO₃-N 1000 ppm）を用いて 0, 1, 10, 100 ppm の測定を行い、検量線を作成した。

2.3.2.2.2. アンモニア態窒素の測定

土壌中のアンモニア態窒素は水溶性のものと、土壌コロイドに吸着された置換態のものが植物に吸収されると考えられている。

通常の土壌条件では亜硝酸から硝酸の移行はスムーズに行われ、土壌中に亜硝酸は蓄積されることはない。過剰施肥で土壌 pH が高くなると亜硝酸化成菌の活動に影響はないが、硝酸化成菌の活動が弱まる。つまりアンモニアから亜硝酸になるが、亜硝酸から硝酸にならず亜硝酸が土壌に蓄積される。その後亜硝酸が硝酸になったとき、土壌の pH が下がるが、pH 5.0 以下になると亜硝酸がガス化し大気中に放出される。亜硝酸ガスは少量でも有害であり、一日で作物が枯死する場合がある。アンモニア態窒素は 5~15 mg /100 g soil が適正值として考えられている。測定は農家のお医者さんキット（富士平工業株式会社）を使用した。以下に詳細を記す。

- [1] 2.3.2.3.1 で抽出したろ液 5 mL を発色用試験官に入れた。
- [2] 試験官の標線まで蒸留水を加えた後、検定試薬 A を 0.5 mL 加え攪拌した。
- [3] 検定試薬 B を 0.5 mL 加え攪拌し、10 分間静置した。
- [4] 分光光度計で測定を行った（波長=660 nm）。

アンモニア標準液 (NH₄-N 1000 ppm) を用いて 0, 1, 2, 4 ppm の測定を行い、検量線を作成した。

2.4. 結果及び考察

2.4.1. 次世代シーケンサを用いた土壤微生物叢解析

土壤の微生物叢解析の結果、の平均リード数は 157616.2、検出された微生物の種類は 1667 種(62 門 175 綱 290 目 356 科 659 属 210 種)であった。土壤微生物叢解析で得られたデータを利用し、コマツナ栽培土壤のサンプルで比較を行った (表 2-1)。

表 2-2. 微生物叢解析のリード数

No.	栽培場所	状態	備考	リード数
1	南ハウス 2	収穫後		170651
2	北ハウス 3	収穫後	生育不良	105555
3	北ハウス 3	消毒後	土壤消毒後	475209
4	北ハウス 3	作付け前		375199
5	北ハウス 3	収穫後	土壤消毒後 8 ヶ月経過	172169
6	北ハウス 3	収穫中(栽培中)	土壤消毒後 1 年経過	141014
7	北ハウス 3	肥料散布済み	土壤消毒後 2 年経過	46544

北ハウス 3 のコマツナ栽培土壤で発生した生育不良の土壤と土壤消毒後の土壤、作付け前の土壤、土壤消毒後 8 ヶ月経過の土壤、土壤消毒後 1 年経過の土壤、土壤消毒後 2 年経過の土壤と生育良好の土壤を行った。微生物叢解析と微生物の機能別の存在割合をグラフ (図 2-1、2-2) に示した。門レベルの微生物叢を生育良好土壤と生育不良土壤で比較したとき、微生物の多様性に大きな違いは見られなかったが、植物生育促進細菌として知られている *Bacillus* 属が属する *Firmicutes* 門や従属栄養細菌などが属する *Gemmatimonadetes* 門、*Acidobacteria* 門等で違いが見られた。生育不良の土壤と土壤消毒後の土壤で比較したとき、*Firmicutes* 門や *Gemmatimonadetes* 門、窒素固定や炭素などの物質循環に関わる細菌が属する *Proteobacteria* 門などで大きく変化していた。門レベルの微生物叢は栽培サイクルによる大きな変動なく増減を繰り返しながらある程度の多様性を保っていた。

微生物の機能別で見たとき生育不良の土壤は生育良好の土壤より窒素循環やリン循環に関わる微生物が少なかった。土壤消毒を行うことで窒素循環やリン循環に関わる微生物の存在割合が増大していることが確認できた。土壤病菌で見た時、生育不良土壤は生育良好土壤より低かったことから、病気による生育不良ではないと考えられる。生育不良は植物の生育に必要な栄養を供給する微生物が少ないことが原因で生育不良が起きた可能性が示唆された。

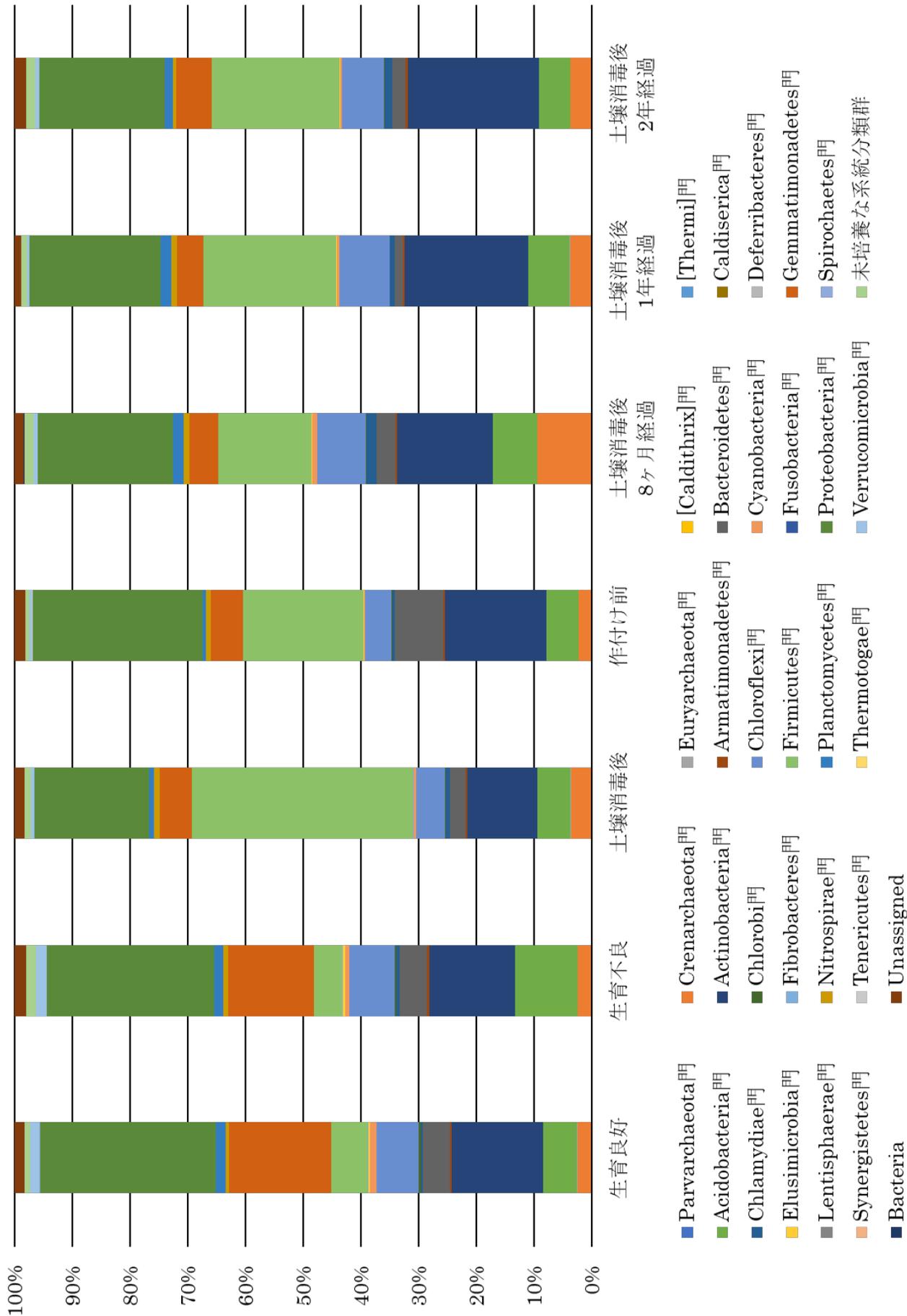


図 2-1. 土壌微生物叢の変化

縦軸は微生物の存在割合を示した。微生物叢解析の結果を門レベルで比較した。

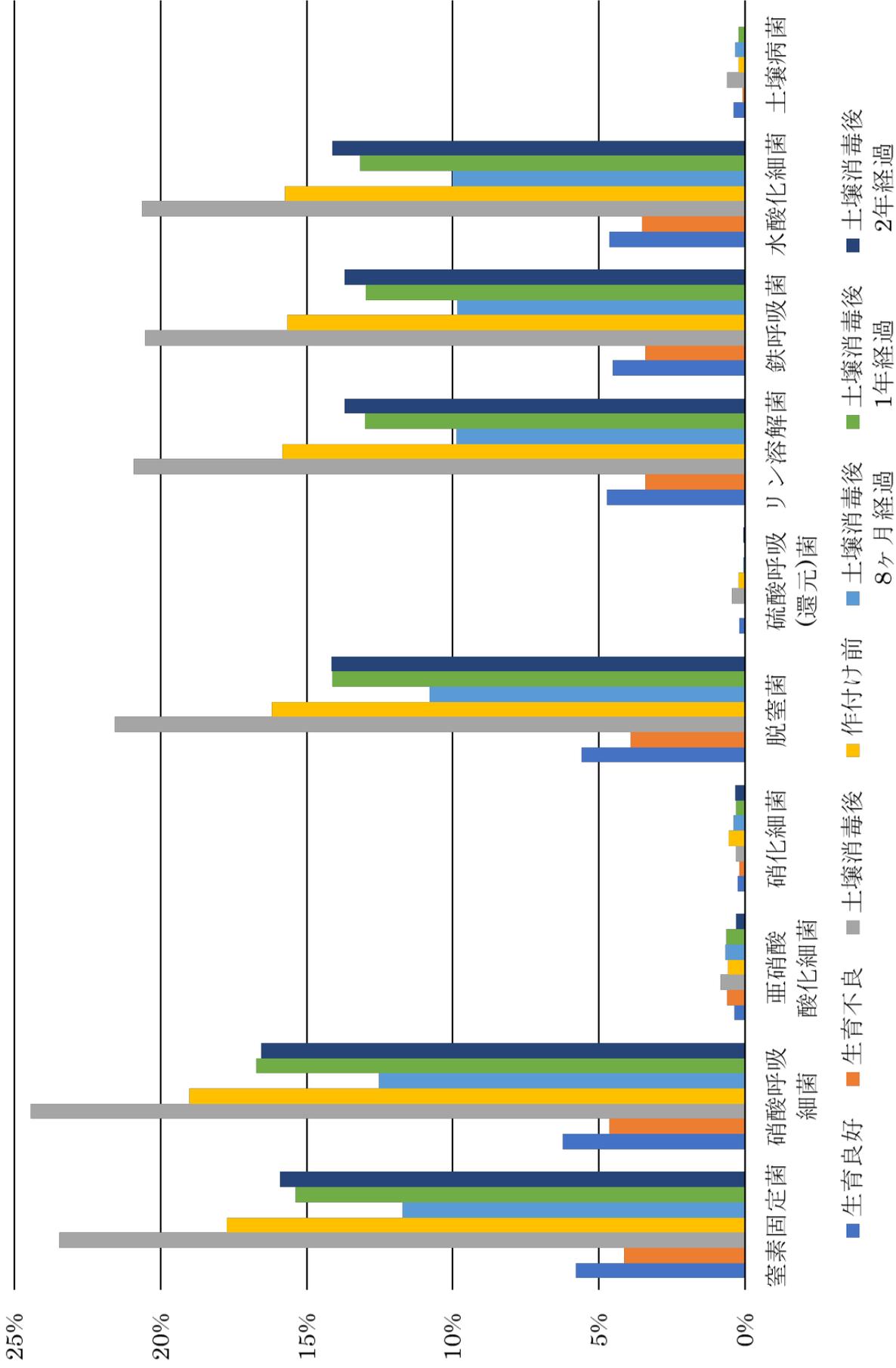


図 2-2. 機能別微生物の変化
 縦軸は微生物の存在割合を示した。微生物叢解析の結果よりそれぞれの微生物が持つ機能から主に窒素循環とリン循環に関わるものと土壌病害について分析した。

2.4.2. 土壌中の栄養

2.4.2.1. リンの測定

採取した土壌サンプルに可給態リン酸とリン酸吸収係数の変動が見られるかを分析した。同じ農家の生育良好の土壌と比較を行った。可給態リン酸とリン酸吸収係数の結果を以下の表に示した（表 2-2）。

表 2-3. 可給態リン酸とリン酸吸収係数の測定結果

No.	栽培場所	状態	備考	可給態リン酸	リン吸収係数
1	南ハウス 2	収穫後		186.32	2100.70
2	北ハウス 3	収穫後	生育不良	86.47	2014.68
3	北ハウス 3	消毒後	土壌消毒後	131.38	2055.08
4	北ハウス 3	作付け前		118.48	1879.71
5	北ハウス 3	収穫後	土壌消毒後 8 ヶ月経過	107.85	1932.46
6	北ハウス 3	収穫中(栽培中)	土壌消毒後 1 年経過	77.34	1835.01
7	北ハウス 3	肥料散布済み	土壌消毒後 2 年経過	94.34	1810.40

※可給態リン酸は 30~100 mg /100 g soil 以上が適正值として考えられている。リン酸吸収係数が 1500 以上の土壌はリン酸を施用しても土壌に吸収されてしまうため、リン酸質肥料を施肥するべきと考えられている。

北ハウス 3 のコマツナ栽培土壌で発生した生育不良の土壌と土壌消毒後の土壌、作付け前の土壌、土壌消毒後 8 ヶ月経過の土壌、土壌消毒後 1 年経過の土壌、土壌消毒後 2 年経過の土壌と生育良好の土壌と比較を行った。可給態リン酸・リン酸吸収係数の変化と関連する菌の存在割合の変化をグラフに示した（図 2-3、2-4）。生育不良の土壌は生育良好の土壌より可給態リン酸は少なかったが、リン酸吸収係数は生育良好の土壌と違いはなかった。生育不良の土壌の可給態リン酸は適正值の範囲だった。可給態リン酸が生育不良の土壌より低い土壌で生育不良が発生していない。このことから、北ハウス 3 で発生したコマツナの生育不良の原因は、リン酸の不足ではないと考えた。

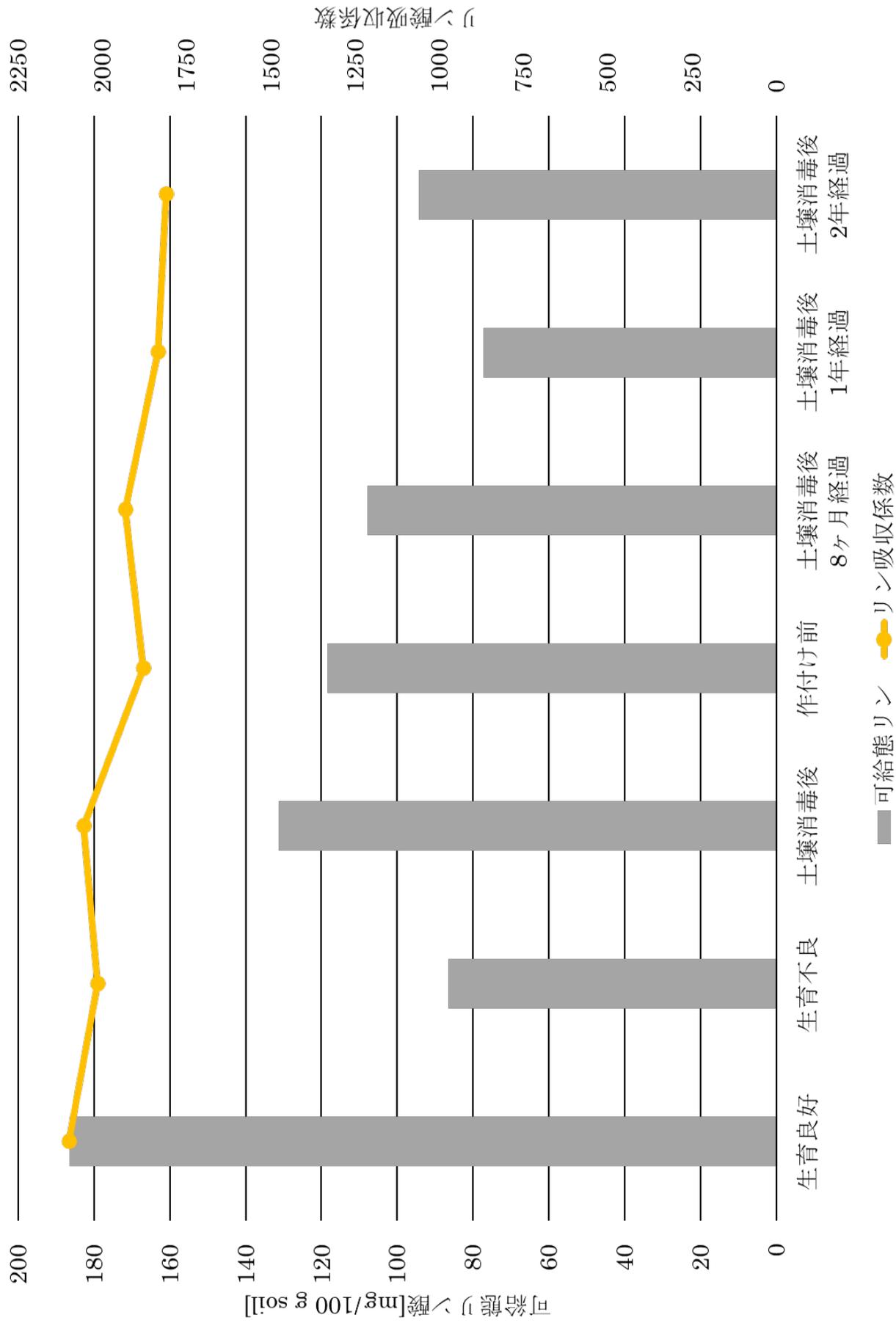


図 2-3. リン量の変化
 縦軸 (左) は可給態リン酸[mg/100 g soil]、縦軸 (右は) リン酸吸収係数を示した。

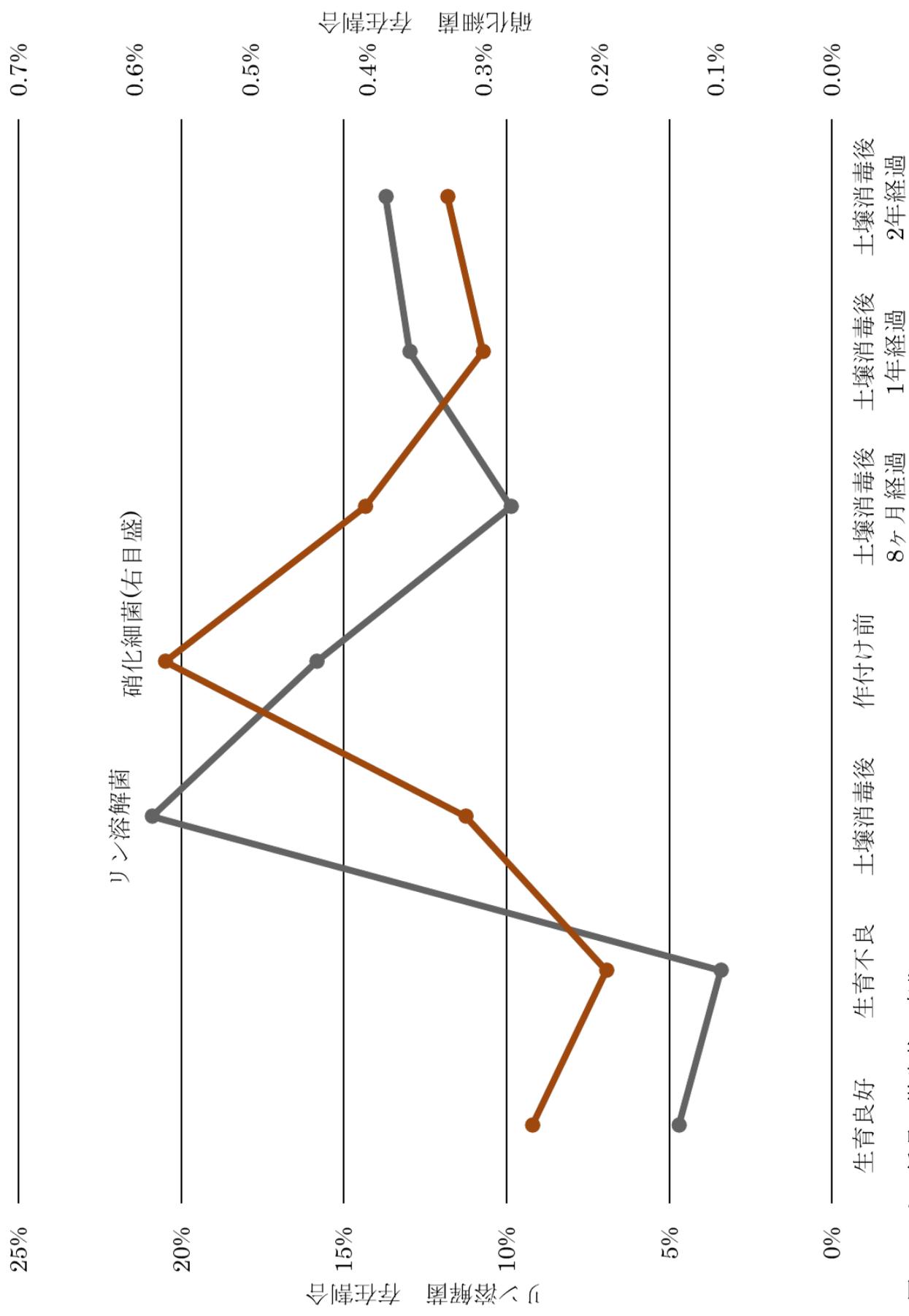


図 2-4. リン循環の微生物の変化
縦軸(左)はリン溶解菌、縦軸(右)は硝化細菌の存在割合を示した。

2.4.2.2. 無機態窒素の測定

採取した土壌サンプルに硝酸態窒素とアンモニア態窒素の変動が見られるかを分析した。硝酸態窒素とアンモニア態窒素の結果を以下の表に示した（表 2-3）。

表 2-4. 硝酸態窒素とアンモニア態窒素の測定結果

No.	栽培場所	状態	備考	アンモニア態窒素	硝酸態窒素
1	南ハウス 2	収穫後		1.15	12.05
2	北ハウス 3	収穫後	生育不良	1.05	4.58
3	北ハウス 3	消毒後	土壌消毒後	1.29	4.24
4	北ハウス 3	作付け前		2.55	15.90
5	北ハウス 3	収穫後	土壌消毒後 8 ヶ月経過	3.60	8.91
6	北ハウス 3	収穫中(栽培中)	土壌消毒後 1 年経過	1.12	2.43
7	北ハウス 3	肥料散布済み	土壌消毒後 2 年経過	1.73	7.18

※アンモニア態窒素は 5~15 mg /100 g soil、硝酸態窒素は 3~8 mg /100 g soil が適正值として考えられている。

北ハウス 3 のコマツナ栽培土壌で発生した生育不良の土壌と土壌消毒後の土壌、作付け前の土壌、土壌消毒後 8 ヶ月経過の土壌、土壌消毒後 1 年経過の土壌、土壌消毒後 2 年経過の土壌と生育良好の土壌と比較を行った。アンモニア態窒素・硝酸態窒素の変化と関連する菌の存在割合をグラフに示した（図 2-5、2-6）。アンモニア態窒素は生育不良の土壌と生育良好の土壌で違いはなかった。生育不良の土壌は生育良好の土壌より硝酸態窒素が少なかった。生育不良土壌では硝酸態窒素が少ないことが原因で生育不良が起きた可能性が示唆された。また、窒素循環関わる微生物を比較したとき、生育不良の土壌は生育良好の土壌より存在割合は低かった。土壌消毒後 1 年経過の土壌は生育不良の土壌より窒素量の少ないが生育不良は発生していない。窒素循環関わる微生物を比較したとき、土壌消毒後 1 年経過の土壌は生育不良の土壌より存在割合は高かった。このことから窒素循環に関わる微生物が少ないことで、硝酸態窒素が不足し生育不良が起きた可能性が示唆された。

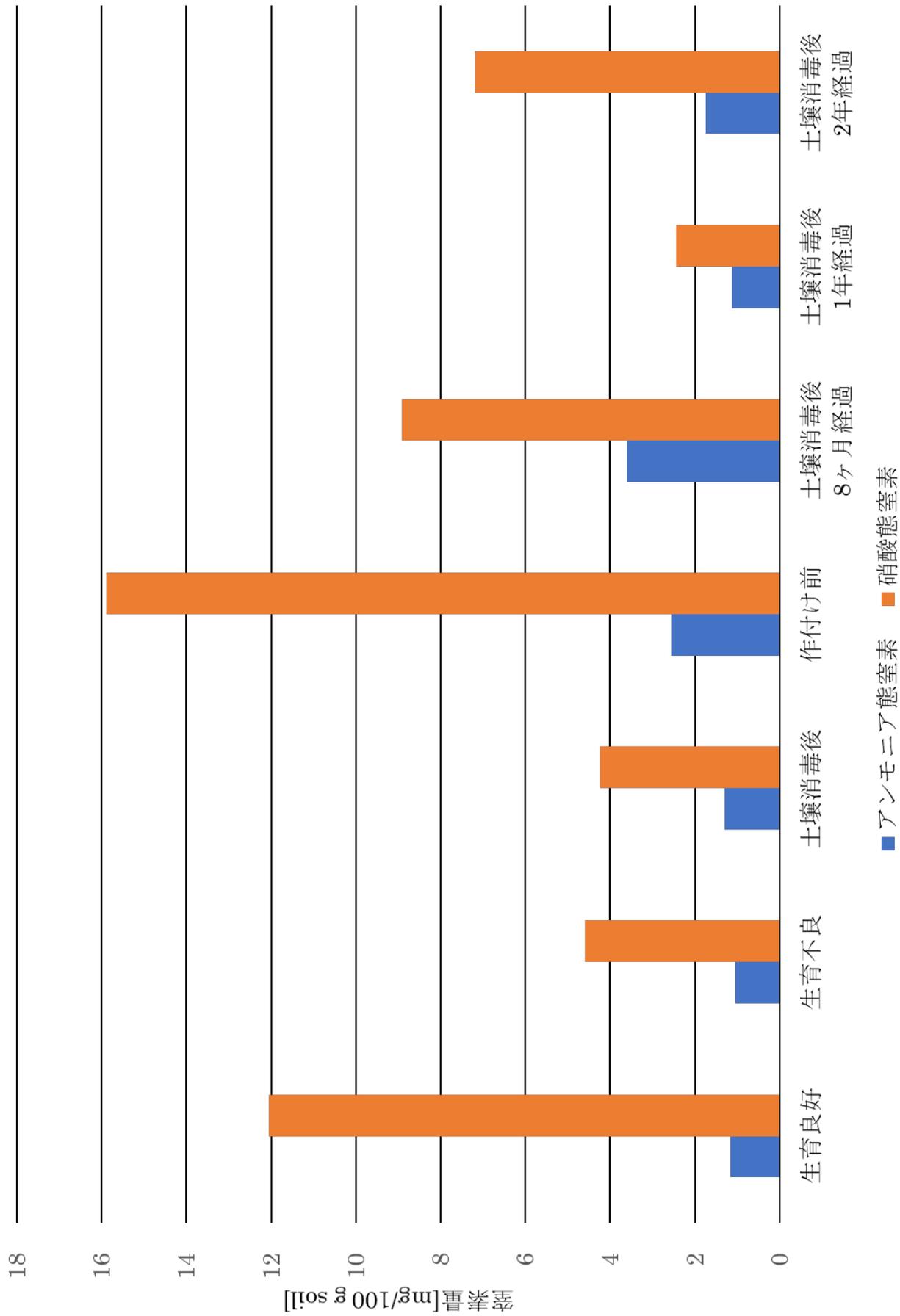


図 2-5. 土壌中のアモニア態窒素・硝酸態窒素の変化
縦軸は窒素量[mg/100 g soil]を示した。

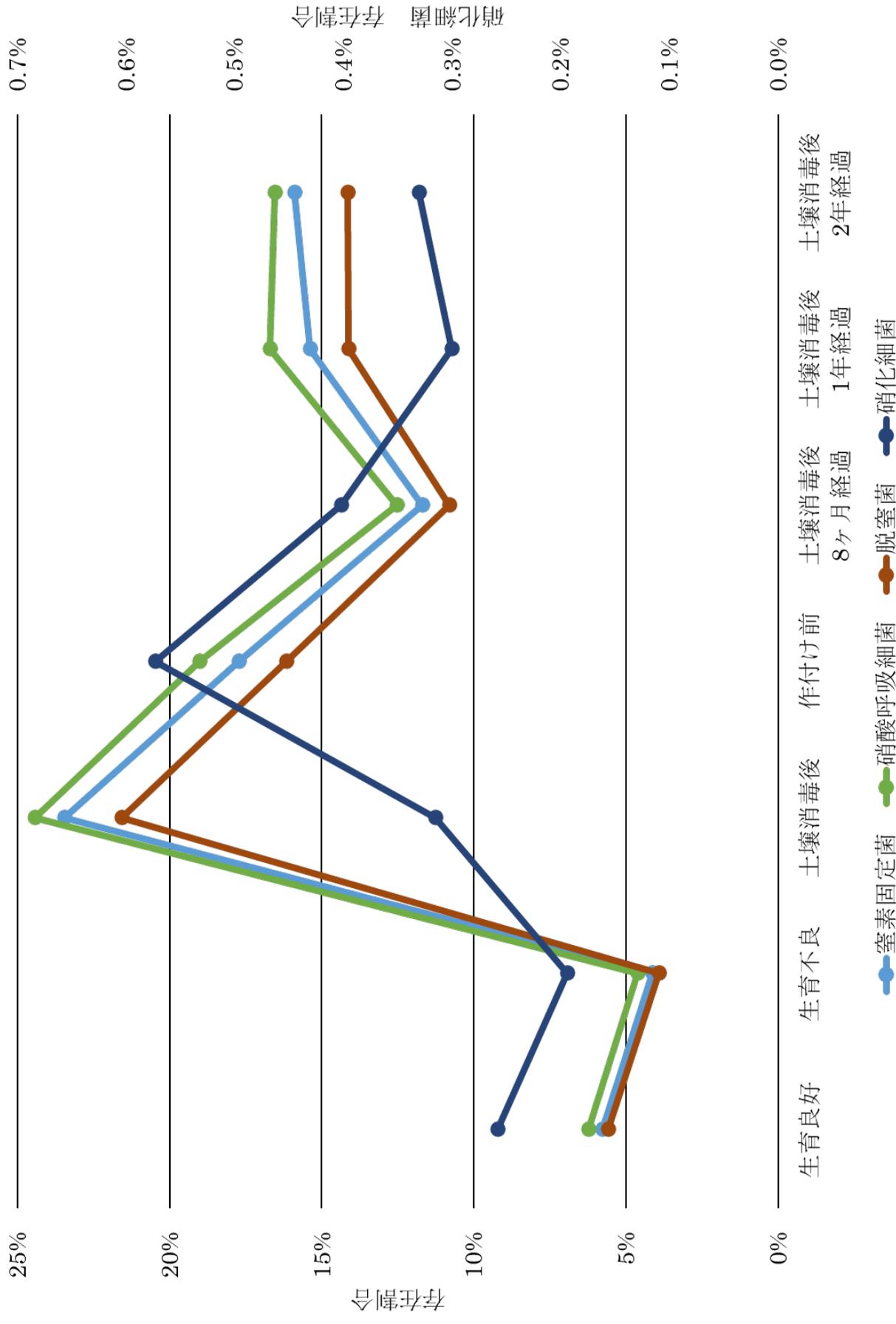


図 2-6. 窒素循環に関わる微生物の変化
 縦軸(右)は硝化細菌の存在割合、縦軸(左)はそれ以外の存在割合を示した。窒素循環に関わる微生物について示した。

2.5.まとめ

生育不良の土壌では生育良好の土壌と比較して、硝酸態窒素が少ないこと、窒素循環に関わる微生物が少ないこと、また、可給態リン酸が少ないこと、リン循環に関わる微生物が少ないこと、が明らかとなった。生育不良の土壌の可給態リン酸は適正值の範囲だった。このことから窒素量および窒素循環に関わる微生物が少ないことで、窒素が不足し生育不良が起きた可能性が示唆された。

生育不良の土壌をくん蒸剤を用いて土壌消毒を行った後、作物の生育が回復していた。この原因は作物の生育に対する微生物による未知の影響であるとの仮説を立てた。そこで生育不良の土壌と土壌消毒後の土壌で存在割合の変化する微生物に注目した。存在割合が変化する微生物が複数存在したため、その中から大きな変化があった微生物についてグラフに示した（図 2-7）。

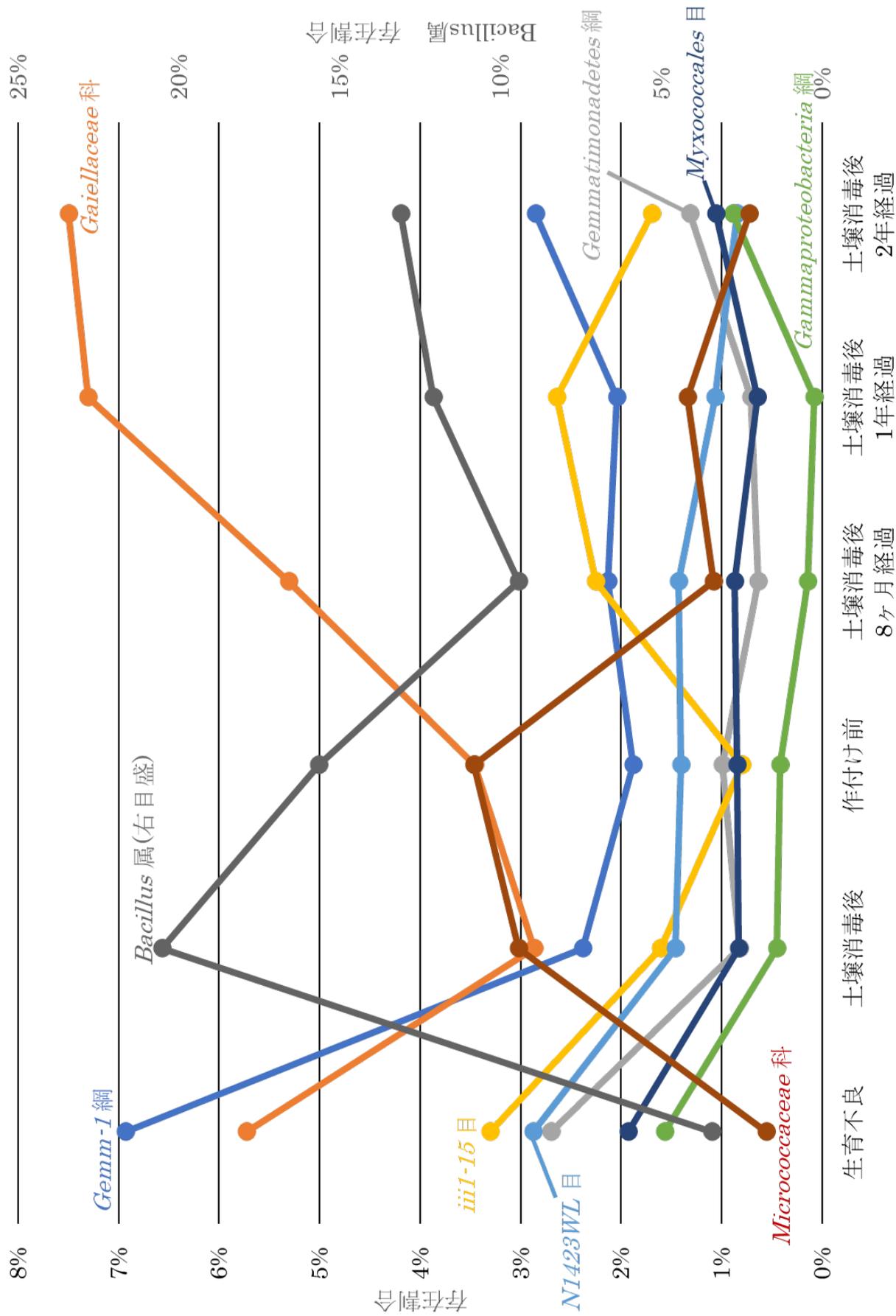


図 2-7. 生育不良土壤と土壤消毒後の土壤の存在割合の変化が大きい微生物
 縦軸(右)は *Bacillus* 属の存在割合、縦軸(左)はそれ以外の存在割合を示した。微生物叢解析の結果より生育不良と土壤消毒で大きく変化している微生物を示した。

土壤消毒後によって存在割合が高くなったのは *Bacillus* 属と *Micrococcaceae* 科であった。*Bacillus* 属は植物生育促進細菌として知られ、窒素固定菌などの物質循環に係わる微生物で、芽胞形成性や好熱性などの特性を有している。このことから、土壤消毒から逃れ、土壤環境や生育の改善に役立っていると考えられる。*Micrococcaceae* 科は微生物資材などに用いられる *Actinobacteria* 門に属し、土壤環境や生育の改善に役立っていると考えられる。

土壤消毒後によって上記以外の微生物の存在割合が低くなっていた。*Gaiellaceae* 科は *Actinobacteria* 門に属している。土壤消毒によって *Gaiellaceae* 科は減少し、それ以降の土壤で増加していることから土壤環境や生育の改善に役立っていると考えられる。次に大きな差が見られた *iii1-15* 目は難培養微生物と知られている *Acidobacteria* 門に属している。このように変化している微生物が作物に影響を与えていると考え、微生物の単離を行った。

くん蒸剤による土壤消毒の前後の微生物叢に大きな違いが見られた。土壤消毒後の土壤で土壤消毒前の土壤と比較して窒素循環やリン循環に関わる微生物などの植物に良い影響を与える微生物の存在割合の増大が確認できた。くん蒸剤による土壤消毒の前後の微生物の変化の知見を得ることが出来た。

第3章 コマツナ栽培土壌からの微生物の単離

3.1. 序言

化学農薬や化学肥料に過度に依存せず高い生産性を発揮する土壌のマイクロバイオーーム解析のデータを取得しデータを分析することで高収量、高品質、耐病性、耐害虫性との相関や、より省労力・省コストでより良い栽培マネジメント法を設計することで、新規の農業用微生物資材や植物成長調節候補物質を見出すことが出来る。例えば、無肥料無農薬のりんご栽培で病気が発生せず収穫に成功した農園と病気が発生し収穫に失敗した農園があった。無肥料無農薬栽培に成功した農園の微生物叢の比較を行ったところ、共通の微生物が多く存在していた。これらの微生物が病害を抑制し栽培が成功していると考えられる。(杉山修一、2017) このような微生物を増やす栽培法などを開発し、低コストで高付加価値の栽培技術の確立といったバイオマス資源の開発は社会的貢献度として非常に高いと言える。このような植物にとって有益な効果を発揮する微生物を発見し、よりよい土壌作りの生産技術を開発する。植物の生育に欠かせない栄養素の循環や吸収には土壌微生物が多くかかわっている。しかし、土壌中に存在するほとんどの微生物は単離がされず機能が解明されていない。

本章では、コマツナ栽培土壌で発生したで生育不良がくん蒸剤を用いて土壌消毒を行った後、作物の生育が回復していた。このことから、土壌消毒後に変化している微生物が作物に影響を与えていると考え、コマツナ栽培土壌から微生物の単離を行った。

3.2. 使用培地

1/10000 NB グランガム培地 (SKT 培地)

0.8 mg/L Difco Nutrient Broth, 6 g/L グランガム, 0.16 g/L CaCl₂

LB 寒天培地

10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast Extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar

3.3. 実験操作

3.3.1. 単離及び微生物種の同定

前章のグラフ(図 2-7)で示したほとんどの微生物は属まで分類されていなかったことから難培養微生物と推定した。Janssen らは NB 培地を 100 倍希釈した培地を使用する事で難培養微生物として知られている *Verrucomicrobia* 門、*Acidobacteria* 門に属する新規微生物の分離に成功している (Janssen et al., 2002)。栄養が少ない培地では、通常の培地と比較してコロニー形成が遅くなる。難培養微生物の多くは生育が遅いものがほとんどであるため培養期間を長くすることでコロニーを取得できる。

固体培地を作製する際に使用するゲル化剤の多くは、寒天を使用している。ゲル化剤として寒天以外ものを使用することで、未知微生物を取得できる可能性を示した研究結果が得られている (Tamaki et al., 2005)。また、寒天を使用する事で生育が遅いと考えられる未知微生物は微生物のコロニー形成阻害物質が含まれている寒天ではコロニー形成ができない

ケースがあると言われている。

より栄養が少ない条件で生育する微生物を単離するため更に 100 倍希釈した NB 培地を使用した。ゲル化剤として寒天ではなく難培養微生物の単離報告があり、透明度が高く観察しやすいゲランガムを使用して単離を行った。培養期間が長い事で様々な微生物が生育してしまうため、目的の微生物の単離は難しい。単離した微生物から目的の微生物を絞り込むため LB 寒天培地を用いて生育するか確認を行った。また、土壤消毒で生き残った微生物は芽胞を形成したと考え、熱による芽胞を形成し更に絞り込んだ。単離は以下のように行った

- [1] 土壤 1.0 g を 4.5 mL の 0.9 %生理食塩水に加え、10 分間静置した。
- [2] 土壤懸濁液を原液として希釈し SKT 培地に撒いた。
- [3] 37°C、4 週間の条件でインキュベートした。
- [4] 単離した菌を、爪楊枝を用いて SKT 培地と LB 寒天培地に植菌した。
- [5] 37°C、4 週間インキュベートした。
- [6] LB 寒天培地で生育せず SKT 培地で生育した菌を補株とした。
- [7] 候補株を生理食塩水に懸濁を行い 80°C、30 分間インキュベートを行った。
- [8] その後、各懸濁液を SKT 培地に植菌した。芽胞形成はウィルツ芽胞染色キット（武藤化学株式会社）を用いて確認した。
- [9] 37°C、4 週間インキュベートした。

生育した微生物を PCR 法により 16S rRNA 遺伝子配列の増幅を行い、微生物種の同定を以下のように行った。

- [1] 生育してきた微生物を滅菌水に懸濁し鋳型とした。
- [2] PCR 反応液は、各プライマー 0.5 μ M、Ex Taq ポリメラーゼ 1.25 U（タカラバイオ株式会社）及び鋳型 DNA を含み反応液の全量を 50 μ L になるように滅菌蒸留水を加えた。プライマーは 16S rRNA 遺伝子配列の領域を増幅させるユニバーサルプライマー（27F、1492R）（Turner et al., 1999; Loy et al., 2002）を用いた。使用したプライマーを以下にまとめた。

27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R : 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'

- [3] PCR を以下の条件で行った。
熱変性 98°C 3 分 : 熱変性 94°C 1 分 → アニーリング 44.9°C 30 秒 → 伸長 72°C 2 分
を 30 サイクル : 最終伸長 72°C 2 分。
- [4] 増幅した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析は株式会社ファスマックに委託した。
- [5] 塩基配列解析によって取得した配列を用いて、NCBI のデータベースを使用し、単離した微生物の同定及び近縁種を推定した。
検索アルゴリズム : BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
対象データベース : NCBI Nucleotide collection

3.4. 結果および考察

生育不良の土壌を使用して単離を行い、9株の微生物を取得した。この9種についてNCBIのデータベースによる微生物同定を行った。単離した株を識別できるようにN7、N11、N13、N22、N35、N39、N41、N49、N53と仮称した。

Uncultured がついた微生物は未培養で機能が分かっていない微生物である。それぞれの候補株で得られた結果を以下に示した（表 3-1～3-9）。

表 3-1. 候補株の N7 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Microbacterium</i> sp. FXJ8.210	99.57%
<i>Microbacterium</i> sp. FXJ8.213	99.57%
<i>Microbacterium</i> sp. FXJ8.198	99.57%

表 3-2. 候補株の N11 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Streptomyces</i> sp. strain C1-2	100.00%
<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> strain B1	100.00%
<i>Streptomyces</i> sp. HRTK192	100.00%

表 3-3. 候補株の N13 の微生物同定結果

Description	同一性
Uncultured <i>Kaistobacter</i> sp. clone Plot29-A11	99.71%
<i>Sphingomonas</i> sp. WX24	99.17%
Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. clone DM1-42	98.77%

表 3-4. 候補株の N22 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Mycobacterium</i> sp. 3519A	100.00%
<i>Mycobacterium</i> sp. strain FXJ1.4240	99.47%
<i>Mycolicibacterium</i> sp. strain MYC292	99.40%

表 3-5. 候補株の N35 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Mycolicibacterium psychrotolerans</i> JCM 13323	99.25%
<i>Mycobacterium</i> sp. B-009	99.25%
<i>Mycobacterium</i> sp. mbc-1	99.25%

表 3-6. 候補株の N39 の微生物同定結果

Description	同一性
Uncultured <i>Hyphomicrobium</i> sp. b18-22	99.76%
Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> JG30-KF-C30	99.76%
Uncultured <i>Hyphomicrobium</i> sp. metaNBAIM8	99.68%

表 3-7. 候補株の N41 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Mycobacterium</i> sp. W1.09-232	99.24%
<i>Mycobacterium</i> sp. OTB74	99.08%
Uncultured bacterium clone 13a	99.08%

表 3-8. 候補株の N49 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Mycobacterium</i> sp. 3519A	100.00%
<i>Mycobacterium</i> sp. strain FXJ1.4240	99.47%
<i>Mycolicibacterium</i> sp. strain MYC292	99.40%

表 3-9. 候補株の N53 の微生物同定結果

Description	同一性
<i>Alicyclobacillaceae</i> bacterium JAM-FM0301	94.8%
Bacterium EA10-ST-6	94.8%
Bacterium EA10-ST-4	94.8%

16S rRNA 遺伝子配列の同一性 (Ident) が 98%以上の種がない場合、ほとんどが新種と考えられる。同定の結果、N7 株は *Microbacterium* 属、N11 株は *Streptomyces* 属、N13 株は未培養の *Kaistobacter* 属、N22 株と N41 株、N49 株は *Mycobacterium* 属、N35 株は *Mycolicibacterium* 属、N39 株は未培養の *Hyphomicrobium* 属、N53 株は *Alicyclobacillaceae* 科であった。

それぞれの同定した微生物が生育不良の土壌の微生物叢解析でどのような変化をしていたのか分析を行った。それぞれの存在割合の変化を以下の図に示した (図 3-1)。N35 の *Mycolicibacterium* 属は微生物叢解析の検出なしであった。

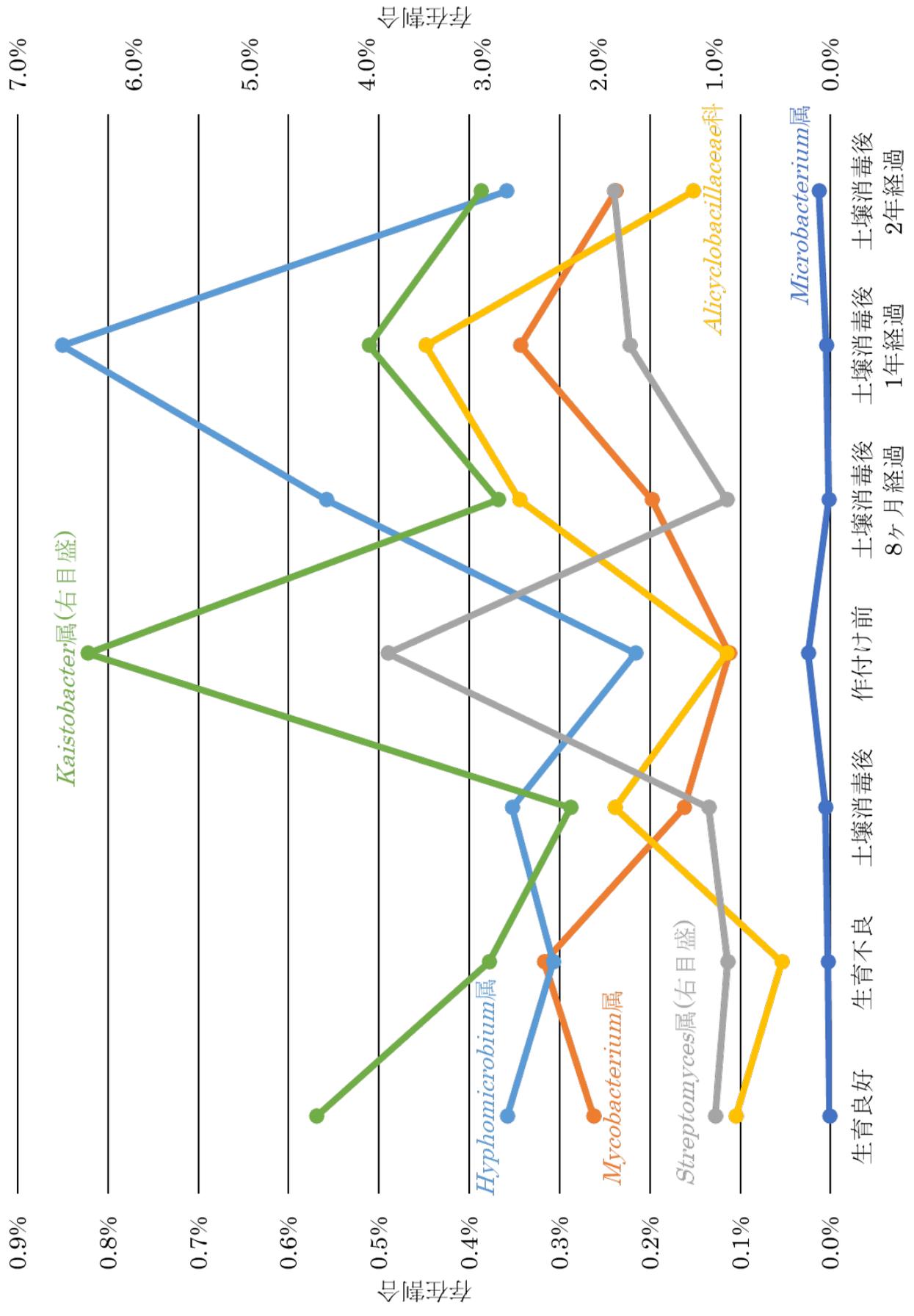


図 3-1. 候補株の土壌中の存在割合の変化
 右の縦軸は *Streptomyces* 属と *Kaistobacter* 属の存在割合、左の縦軸はそれ以外の存在割合を示した。

生育良好と生育不良の土壌を比較したところ、*Streptomyces* 属や *Kaistobacter* 属、*Hyphomicrobium* 属、*Alicyclobacillaceae* 科は生育不良で存在割合が減少し、*Mycobacterium* 属は増加していた。これらが作物の生育に影響を与えている可能性が示唆されたので、その後どのような変化があったか分析した。

Kaistobacter 属の存在割合は生育不良の土壌と比較して土壌消毒後の土壌で減少していた。その後、作付け前の土壌で増加していたが、8 ヶ月後の土壌で大きく減少している。*Streptomyces* 属の存在割合は生育不良の土壌と比較して土壌消毒後の土壌に増加していた。その後、作付け前の土壌で増加していたが、8 ヶ月後の土壌で大きく減少している。これらの属は生育不良の土壌と似た存在割合だったが作物の生育などに問題は発生していない。このことから作物に対して直接的な影響はない可能性が示唆された。

Mycobacterium 属の存在割合は生育不良の土壌と比較して土壌消毒後の土壌で減少していた。作物に悪影響を与える可能性を示唆された。しかし、1 年後の土壌で生育不良の土壌より高い存在割合だったが生育に影響はなかった。このことから *Mycobacterium* 属は作物にとって悪影響を与えない可能性が示唆された。

Hyphomicrobium 属の N39 株と *Alicyclobacillaceae* 科の N53 株の存在割合は土壌消毒後の土壌で生育不良土壌よりが高くなった。その後、8 ヶ月後の土壌や1 年後の土壌で高くなっていることから作物に良い影響を与える可能性が示唆された。この N39 株と N53 株に注目しそれぞれ skT39 株と skT53 株と名付けた。skT39 株はその後の培養が上手くいかなかったため、skT53 株についてどのような特性を持ち、植物にどのような影響を与えるか調べた。

第4章 単離した skT53 株の特性

4.1. 序言

4.1.1. *Alicyclobacillaceae* 科について

Alicyclobacillaceae 科は da Costa と Rainey (2009) によって設立された。初期は *Alicyclobacillus* 属のみ属していた。*Alicyclobacillus* 属の多くのメンバーは ω -脂環式脂肪酸からなる細胞脂肪酸を持ち、芽胞形成性の好酸性細菌および好熱性細菌が属している (Wisotzkey et al., 1992)。新たに *Kyrpidia* 属 (Klenk et al., 2011) と *Tumebacillus* 属 (Steven et al., 2008) が追加された。*Kyrpidia* 属には 2 種 (Bonjour and Arago, 1984; Reiner et al., 2018) が属し芽胞形成性、好熱性および好酸性である。*Tumebacillus* 属に属する種は芽胞形成性および中温性である。*Alicyclobacillus* 属に属する代表的な細菌は ω -脂環式脂肪酸を有しているが、 ω -脂環式脂肪酸が検出されないものもいくつか確認されている。*Alicyclobacillus* 属の中で *A. consociatus* と *A. pohliae* と命名された従来知られていた種とは系統的に異なる 2 つの種が確立された (Glaeser et al., 2013; Imperio and Marri, 2008)。その後、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析に基づき、これら 2 種は 2014 年に *Effusibacillus lacus* と共に新たな属、*Effusibacillus* 属に再分類された (Watanabe et al., 2014)。*Effusibacillus* 属のメンバーは、桿菌で芽胞形成し、通性嫌気性または好気性、主要な細胞脂肪酸は分岐鎖脂肪酸である。

4.1.2. 目的

本章では前章で *Alicyclobacillaceae* 科に属する skT53 株は作物に良い影響を与える可能性が示唆された。そこで skT53 株の分子系統解析に基づく分類と形態学的な特徴の観察、生理・生化学的性状の試験、細胞成分の化学分析や遺伝子の解析による分類・同定および全ゲノム配列の解析を行った。また、作物の生育への影響を調べた。

4.2. 使用培地

1/10000 NB グランガム培地 (SKT 培地)

0.8 mg/L Difco Nutrient Broth, 6 g/L グランガム, 0.16 g/L CaCl₂

LB 寒天培地

10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast Extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar

普通寒天培地

5 g/L Beef Extract, 10 g/L Peptone, 5 g/L NaCl, 15 g/L Agar

標準寒天培地

5 g/L Beef Extract, 10 g/L Peptone, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L Yeast Extract, 1 g/L glucose, 15 g/L Agar

グランガム培地

6 g/L グランガム, 0.16 g/L CaCl₂

寒天培地

15 g/L Agar

API50CHB 培地 (pH7.4-7.8)

2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L Yeast Extract, 1 g/L Tryptone, 3.22 g/L Na₂HPO₄, 0.12 g/L KH₂PO₄, 0.17 g/L Phenol Red, 10 mL trace element mixture

BA 培地 (pH4.0)

1.0 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 0.1 g/L NH₄Cl, 0.1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L KCl, 1mL trace element mixture, 1 mL Selenite-tungstate solution, 1 mL Vitamin mixture, 1 mL Thiamine solution, 1mL Vitamin B12 solution

Solution 溶液は Widdel and Bak (1992) に記載に従って調製した。

YEM 培地 (pH5.0)

1.388 g/L Na₂HPO₄, 1.0 g/L K₂HPO₄, 0.03 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g/L NH₄Cl, 2.0 g/L Yeast Extract

糖資化性試験培地

1.0 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 0.1 g/L NH₄Cl, 0.1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L KCl, 1mL trace element mixture, 1 mL Selenite-tungstate solution, 1 mL Vitamin mixture, 1 mL Thiamine solution, 1mL Vitamin B12 solution, 20 mM MES-NaOH (pH 5.0)

Solution 溶液は Widdel and Bak (1992) に記載に従って調製した。

4.3. 実験操作

4.3.1. 分子系統解析

正確な系統樹を作成するために skT53 株の正確な 16S rRNA 遺伝子配列解析を行った。塩基配列解析の性質上、PCR 産物の最初と最後の配列で信頼性の高い解析ができないことから、前章で取得した 16S rRNA 遺伝子配列では系統樹の信頼性が低いと考えた。そこで正確な 16S rRNA 遺伝子配列の取得のため複数のプライマーを使用した塩基配列解析を以下のように行った。

[1] skT53 株を滅菌水に懸濁し鋳型とした。

[2] PCR 反応液は、各プライマー 0.25 μM、2×PrimeSTAR Max Premix 25 μL (タカラバイオ株式会社) 及び鋳型 DNA を含み反応液の全量を 50 μL になるように滅菌蒸留水を加えた。プライマーは 16S rRNA の領域を増幅させるユニバーサルプライマー (27F、1492R) を用いた。

[3] PCR を以下の条件で行った。

熱変性 98°C 10 秒→アニーリング 55°C 15 秒→伸長 72°C 10 秒を 30 サイクル。

[4] 増幅した DNA の塩基配列解析は株式会社ファスマックに委託した。

解析には、ユニバーサルプライマーの 9F、515F、1099F、536R、926R、1510R を使用した (Lane et al., 1985; Turner et al., 1999; Lane 1991; 中川ら, 2001)。

使用したユニバーサルプライマーを以下にまとめた。

9F : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
515F : 5'-GTGCCAGCAGCCGCGGT-3'
1099F : 5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'
536R : 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'
926R : 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'
1510R : 5'-GGCTACCTTGTTACGA-3'

[5] 取得した skT53 株と *Alicyclobacillaceae* 科に属する各種の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を使用して系統樹を作成した。作成した系統樹は NJ 法と ML 法、MP 法を MEGA X プログラム (Kumar et al., 2018) を使用して作成した。

[6] 系統樹の正確性を評価するため bootstrap 分析を 1000 回実行した。

4.3.2. 最適な培地の検討

単離した skT53 株は 37°C、4 週間インキュベートと長時間培養することで取得している。そのため、最適な栄養条件の培地があると考えスクリーニングで使用した LB 寒天培地とは異なる栄養を含む普通寒天培地、標準寒天培地での生育と SKT 培地の少ない栄養で生育していることから skT53 株は無栄養条件下で生育する可能性があるため、寒天のみの寒天培地とゲランガムのみのゲランガム培地の 5 種類の培地で培養を行った。また、最適な培地の検討を株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。

4.3.3. 形態学的な特徴の観察及び生理・生化学的性状の試験

skT53 株の細菌形態観察及び生理・生化学的性状試験を株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。顕微鏡は実体顕微鏡 (SMZ800N ; 株式会社ニコン) と光学顕微鏡 (BX50F4 ; オリンパス株式会社) を使用して観察を行った。グラム染色はフェイバーG「ニッスイ」(日水製薬株式会社) を使用し、芽胞染色はウィルツ芽胞染色キット (武藤化学株式会社) を使用して、細胞を染色し使用して観察した。Barrow and Feltham (1993) の方法を基に、カタラーゼ及びオキシダーゼ活性についての試験を行った。

4.3.4. 嫌気条件下の生育

微生物には酸素によって増殖に大きな影響を受ける。微生物には、好気性菌や偏性嫌気性菌、通性嫌気性菌の三つに分けられる。好気性菌は増殖に酸素を必要とし、偏性嫌気性菌は酸素を必要としない。通性嫌気性菌は酸素が存在する場合は酸素を利用し、酸素が存在しない場合は硝酸塩などを利用して増殖する。嫌気性での生育を評価するため YEM 寒天培地に植菌し嫌気培養キット「アネロパックシステム」(三菱ガス化学株式会社) を使用して評価を行った。培養は 37°C、48 時間インキュベートした。

4.3.5. 至適温度、至適 pH

skT53 株の生育の至適温度の試験は YEM 培地に植菌を行い、30°C から 80°C の範囲で

11の異なる温度（30、37、40、41、44、50、52、54、55、60、80℃）で48時間インキュベートを行った。50、52、54、55、60、80℃は固体培地で残りの温度を液体培地で培養を行った。固体培地への接種は画線法を行った。

生育の至適 pH の試験は YEM 培地を HCl 及び NaOH を用いて pH4.0～7.0 の間で4段階に調製を行った。pH 調製を行った YEM 寒天培地に skT53 株を植菌し、37℃、3日以上インキュベートした。

4.3.6. API50CH を用いた炭水化物代謝試験

skT53 株の API50CH (BioMérieux, France) を用いて 49 種類の糖の酸化試験を行った。試験で使用した培地は、API50CHB 培地と BA 培地を用いて試験を行った。キットで調べられる糖について以下の表にまとめた (表 4-1)。

表 4-1. API50CH 試験項目の基質成分

Glycerol	D-Mannitol	D-Melezitose
Erythritol	D-Sorbitol	D-Raffinose
D-Arabinose	Methyl- α -D-Mannopyranoside	Starch
L-Arabinose	Methyl- α -D-Glucopyranoside	Glycogen
D-Ribose	N-Acetylglucosamine	Xylitol
D-Xylose	Amygdalin	Gentiobiose
L-Xylose	Arbutin	D-Turanose
D-Adonitol	Esculin-ferric-citrate	D-Lyxose
Methyl- β -D-Xylopyranoside	Salicin	D-Tagatose
D-Galactose	D-Cellobiose	D-Fucose
D-Glucose	D-Maltose	L-Fucose
D-Fructose	D-Lactose	D-Arabitol
D-Mannose	D-Melibiose	L-Arabitol
L-Sorbose	D-Sucrose	Gluconate
L-Rhamnose	D-Trehalose	2-Ketogluconate
Dulcitol	Inulin	5-Ketogluconate
Inositol		

4.3.7. 炭素源の資化性試験

API50CH で酸化試験の 49 種だけでなく *Effusibacillus lacus* で糖の資化性試験で利用された 13 種の糖 (D-glucose, D-galactose, D-arabinose, sucrose, cellobiose, D-fructose, maltose, mannose, melibiose, D-sorbitol, trehalose, D-xylose, N-acetylglucosamine) と 5

種類の有機酸 (acetate, fumarate, D-lactate, L-lactate, succinate)、Yeast Extract についての資化性実験を以下のように行った。

- [1] skT53 株を YEM 液体培地に植菌し、50°C、24 時間の振盪培養を行った。
- [2] 資化性試験培地にそれぞれの有機質を終濃度 10 mM になるように添加した。また、Yeast Extract を終濃度 2 g/L になるように添加した。
- [3] 前培養液を資化性試験培地に添加し、50°C、7 日間振盪培養を行った。
- [4] 生育は OD (660nm) で測定を行った。

4.3.8. 酵素活性試験

skT53 株の APIZYM (BioMérieux, France) を用いた 19 種の酵素活性試験を行った。キットで調べられる酵素と基質について以下の表にまとめた (表 4-2)。

表 4-2. APIZYM 試験項目の酵素及び基質

酵素	基質	酵素	基質
アルカリフォスファターゼ	2-ナフチルホスフェイト	ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドラーゼ	ナフトール-AS-BI-ホスフェイト
エステラーゼ(C4)	2-ナフチルブチレイト	α ガラクトシダーゼ	6-Br-2-ナフチル- α -D-ガラクトピラノシド
エステラーゼリパーゼ(C8)	2-ナフチルカプリレイト	β ガラクトシダーゼ	2-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシド
リパーゼ(C14)	2-ナフチルミリステイト	β グルクロニダーゼ	ナフトール-AS-BI- β -D-グルクロニド
ロイシンアリルアミダーゼ	L-ロイシル-2-ナフチルアミド	α グルコシダーゼ	2-ナフチル- α -D-グルコピラノシド
バリンアリルアミダーゼ	L-バリル-2-ナフチルアミド	β グルコシダーゼ	6-Br-2-ナフチル- β -D-グルコピラノシド
シスチンアリルアミダーゼ	L-シスチル-2-ナフチルアミド	N-アセチル- β グルコサミニダーゼ	1-ナフチル-N-アセチル- β -D-グルコサミド
トリプシン	N-ベンゾイル-DL-アルギニン-2-ナフチルアミド	α マンノシダーゼ	6-Br-2-ナフチル- α -D-マンノピラノシド
α キモトリプシン	N-グルタリル-フェニルアラニン-2-ナフチルアミド	α フコシダーゼ	2-ナフチル- α -L-フコピラノシド
酸性フォスファターゼ	2-ナフチルホスフェイト		

4.3.9. 脂肪酸およびキノン分析

skT53 株のメナキノンの抽出は Collins ら (1977) に記載されている方法に従って行い、分析は HPLC (Kroppenstedt 1982) を用いて行った。

極性脂質は、凍結乾燥した細胞 100 mg から抽出し Minnikin ら (1979) が記載した方法で精製し、第 1 方向にクロロホルム/メタノール/水 (65 : 25 : 4、体積比)、第 2 方向にクロロホルム/酢酸/メタノール/水 (80 : 18 : 12 : 5、体積比) を用いた薄層クロマトグラフィーで分析した。

細胞内の脂肪酸メチルエステルは、Sherlock Microbial Identification System (Sasser, 1990) の標準プロトコルに従い、Sherlock Midi ソフトウェア (バージョン 6.2) と TSBA6 データベースを用いて、ガスクロマトグラフィー (6890 N; Agilent Technologies, USA) により同定・定量した。

ペプチドグリカンのアミノ酸は、HPLC を用いて分析した (Hamada et al., 2012)。細胞壁ペプチドグリカン中のジアミノピメリン酸 (DAP) の異性体は、Hasegawa (1983) の記載に従って決定した。

4.3.10. 全ゲノム配列解析、G+C 含量

skT53 株の全ゲノム配列を解析するため、ゲノム抽出を行った。ゲノム抽出は、培養した skT53 株を Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) を使用して抽出した。ゲノム配列の決定は、PacBio RSII を用いて株式会社マクロジェン・ジャパンに委託した。得られた菌株のリードは、FALCON-integrated version 2.14 を用いてアセンブルした。ソフトウェアのパラメーターは default で使用した。アセンブリの完全性は、Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO, V.3.0) ソフトウェア (<https://busco.ezlab.org>) (Simao et al., 2015) を用いて、細菌データベース odb9 を使用して評価し、スコア化した。得られたゲノム配列のアノテーションは DDBJ Fast Annotation and Submission Tool ((DFAST; <https://dfast.nig.ac.jp>) (Tanizawa et al., 2018) を用いて行った。

4.3.10.1. コンセンサス系統樹の作成

コンセンサス系統樹是一群の系統樹の共通の特長を要約したものである。コンセンサス系統樹は、automated multi-locus species tree (autoMLST)

(<https://automlst.ziemertlab.com>) (Alanjary et al., 2019) を用いて、skT53 株のコア遺伝子と NCBI Assembly データベースに登録されている *Alicyclobacillaceae* 科の種とデータに基づいて構築した。

4.3.10.2. Average Nucleotide Identity (ANI) 法

ANI 解析は単離株と比較株の完全長ゲノム配列やドラフトゲノム配列の類似度を PC 上で計算し、新種か否か判断する。ANI 値が 95%以上で同種、95%未満で新種として判断される。BLAST に基づく ANI 値は ANI Calculator

(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) (Yoon et al., 2017b; Gorist al., 2007) を用いて決定した。

4.3.10.3. Digital DNA-DNA Hybridization (dDDH) 法を用いた菌の同定

DDH 法は、ANI 解析と同様に単離株が新種か否か判断する。単離株と比較株のゲノム DNA のハイブリッド形成の割合から、DNA 相同値が 70%以上で同種、70%未満で新種として判断される。DDH 法は単離株に対して 1 つの比較株との判断を行うため多数の近縁種との比較には時間がかかる。dDDH 法は得られたゲノム配列を基にデジタルでハイブリッド形成させ dDDH 値を求める。dDDH 値は Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 (GGDC; <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) (Auch et al., 2010; Meier-Kolthoff et al., 2013a, b) を用いて算出した。dDDH の解析には以下の数式を適用した。

$$d(x, y) = 1 - \frac{I_{xy} + I_{yx}}{H_{xy} + H_{yx}}$$

4.3.11. skT53 株を接種した土壌でのコマツナ生育試験

skT53 株が作物に与える影響を調べるためにコマツナを使用して生育試験を以下のように行った。比較として、skT53 株の未接種条件の生育試験を行った。

- [1] skT53 株を YEM 液体培地に植菌し、50°C、20 時間の振盪培養を行った。
- [2] skT53 株に最適な pH5.0 にするため野菜の培養土と無調整ピートモスを 1 : 1 (体積比) で混合を行った。
- [3] skT53 株の接種条件は混合土壌 1 L に対して培養液 20 mL を混合した。
- [4] 1 プランターにつきコマツナの種 3 つ播種を行った。
- [5] 温度は 20°C に設定し、光源は 12 時間ごとに点灯を繰り返した。
- [6] 発芽後、温度を 15°C に変更した。
- [7] 追肥として 1 週間ごとにハイポネックスを添加した。
- [8] 発芽 5 週間後にコマツナの生育測定を行った。

4.4. 結果及び考察

4.4.1. 分子系統解析

Alicyclobacillaceae 科の各種と skT53 株の系統樹 (NJ 法、MP 法、ML 法) を図に示した (図 4-1、4-2、4-3)。系統樹より skT53 株は *Effusibacillus* 属のグループに属していることが判明し、節や進化距離から新種と示唆された。

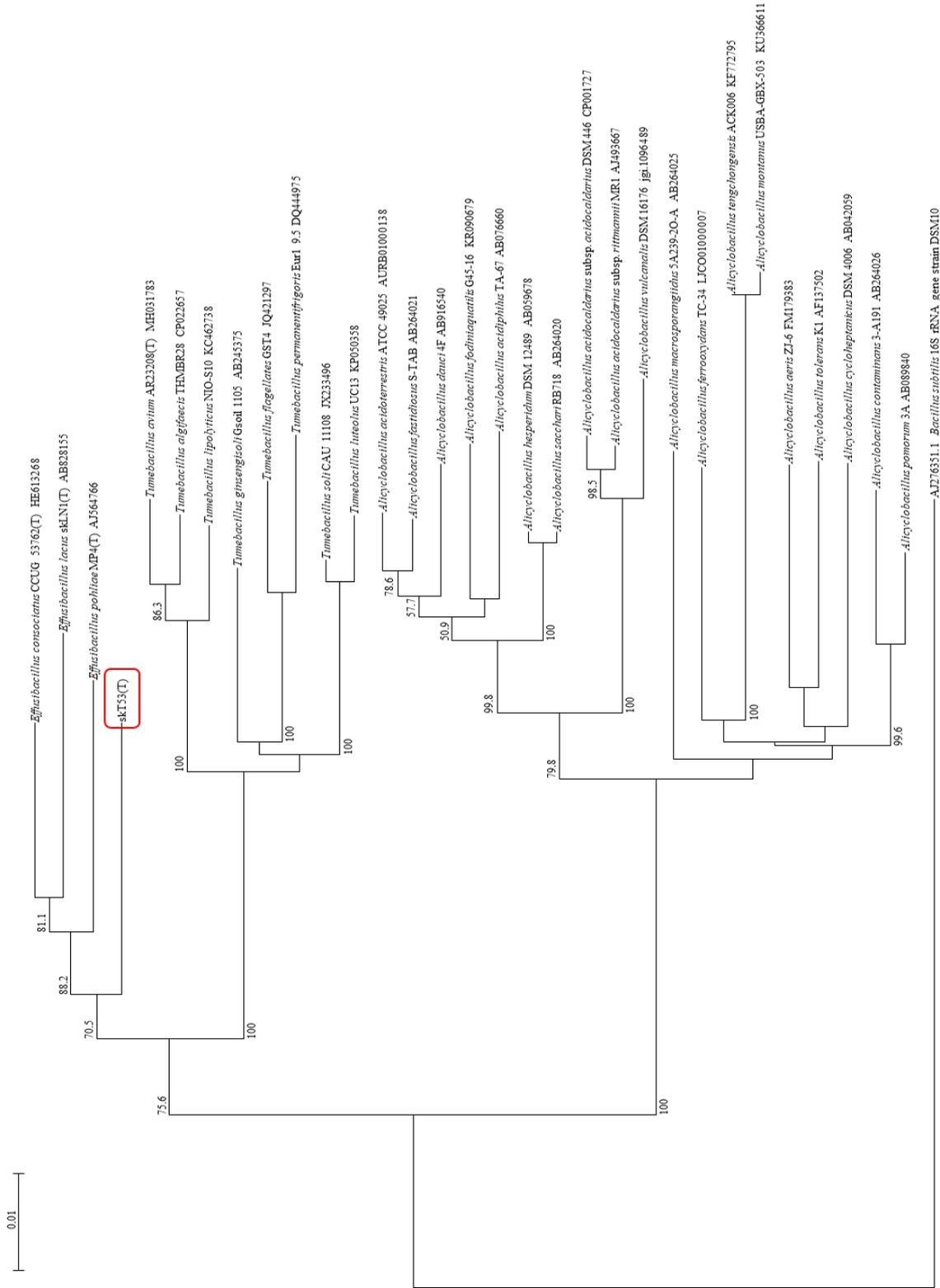


図 4-1. NJ 法を用いた系統樹
 分岐点の数字は、1000 回の複製から得られた 50%以上のブートストラップ値のパーセンテージを示した。バーは、ヌクレオチド位置ごとに 0.01 個の置換を示している。

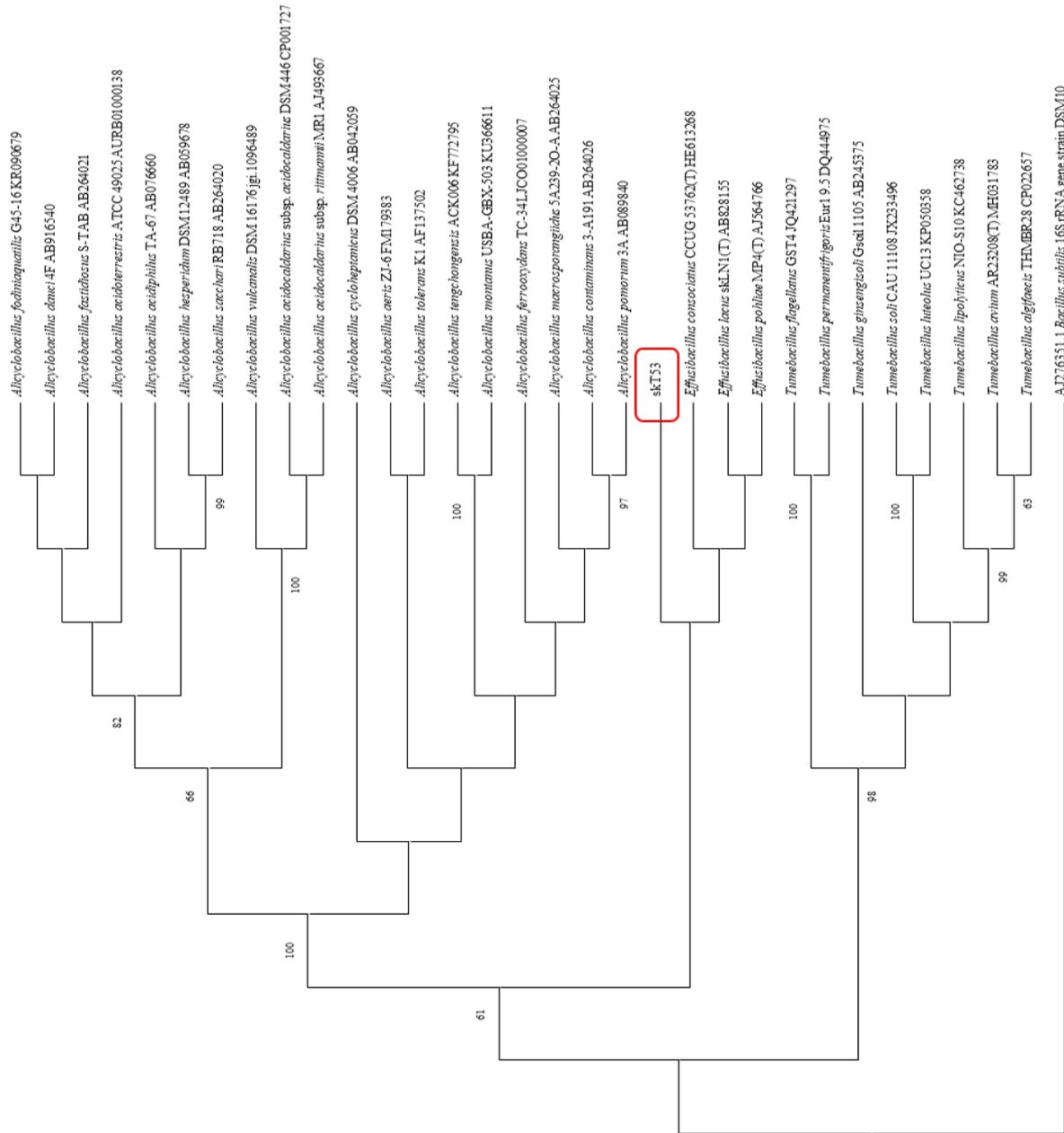


図 4-2. MP 法を用いた系統樹
分岐点の数字は、1000 回の複製で得られたブートストラップ値が 50%を超えた割合を示した。

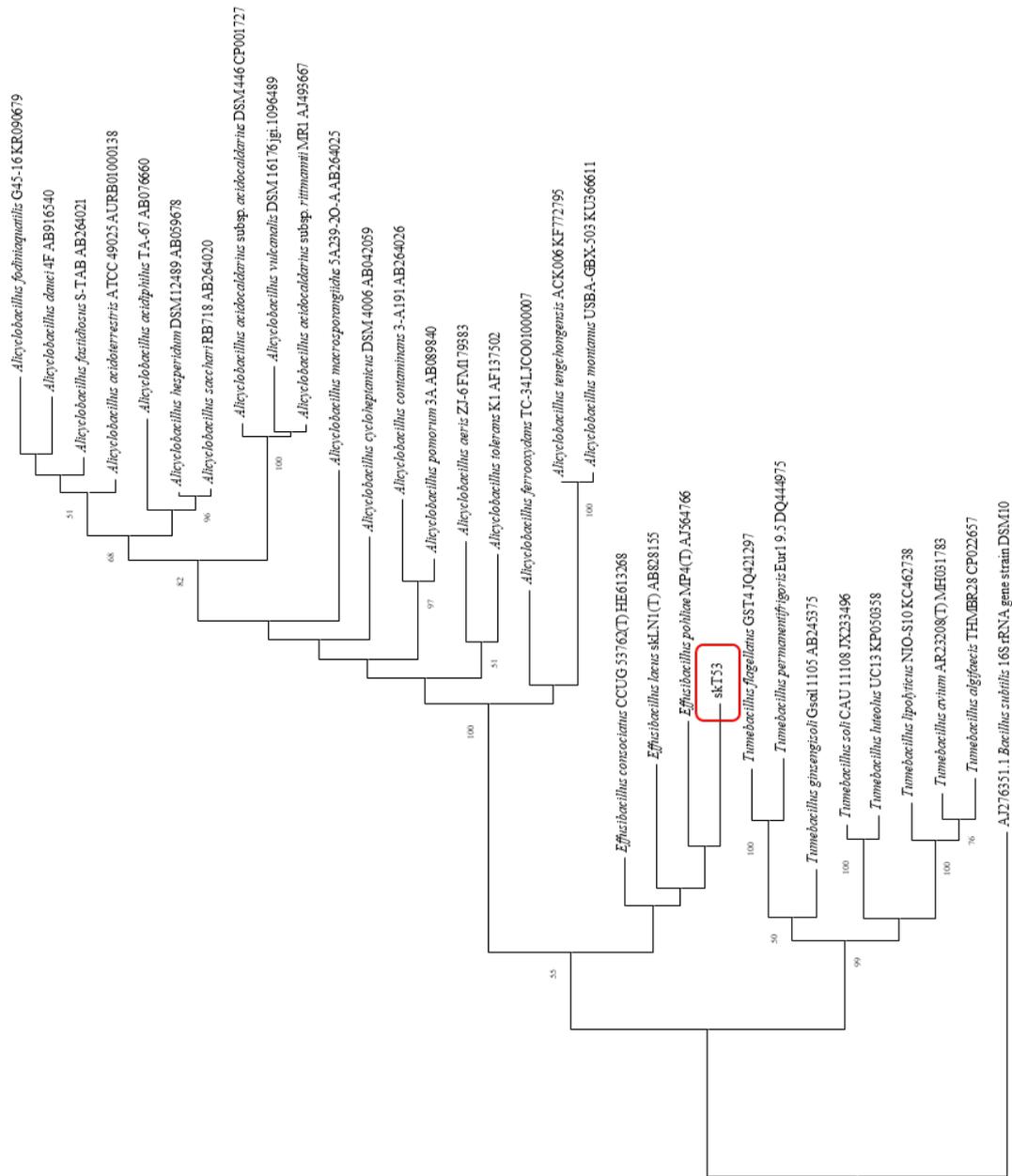


図 4-3. ML 法を用いた系統樹

分岐点の数字は、1000 回の複製から得られた 50%以上のブートストラップ値のパーセンテージを示した。バーは、ヌクレオチド位置ごとに 0.02 個の置換を示した。

4.4.2. 最適な培地の検討

LB 培地、普通寒天培地、標準寒天培地の培養では生育しなかった。栄養が豊富な培地では生育しないと判明した。

ゲランガム培地、寒天培地では生育を確認した。寒天培地はゲランガム培地に比べ生育は悪かった。skT53 株はゲランガムと寒天を資化して生育した可能性が考えられる。

株式会社テクノスルガ・ラボから YEM 寒天培地で 37°C、48 時間で生育することが報告された。

4.4.3. 形態学的な特徴の観察及び生理・生化学的性状の試験

株式会社テクノスルガ・ラボから以下の表の結果を得られた（表 4-3）。

表 4-3. 形態学的な特徴の観察及び生理・生化学的性状の試験結果

試験項目	結果	試験項目	結果
培養温度	37°C	培地	YEM 寒天培地、pH5.0
細胞形態	桿菌 (0.6-0.8× 2.0-10.0 μm)	培養時間	48 時間
		直径	1~2 mm
グラム染色性	+	色調	淡黄色
芽胞の有無	+(膨張あり)	形	円形
運動性	+	隆起状態	レンズ状
カタラーゼ反応	-	周縁	全縁
オキシダーゼ反応	+	隆起状態	表面の形状
		周縁	透明度
		粘稠度	スムーズ

陽性の場合には+、陰性の場合には-と表記した。

コロニーやグラム染色、芽胞の様子を以下の図に示した（図 4-4）。

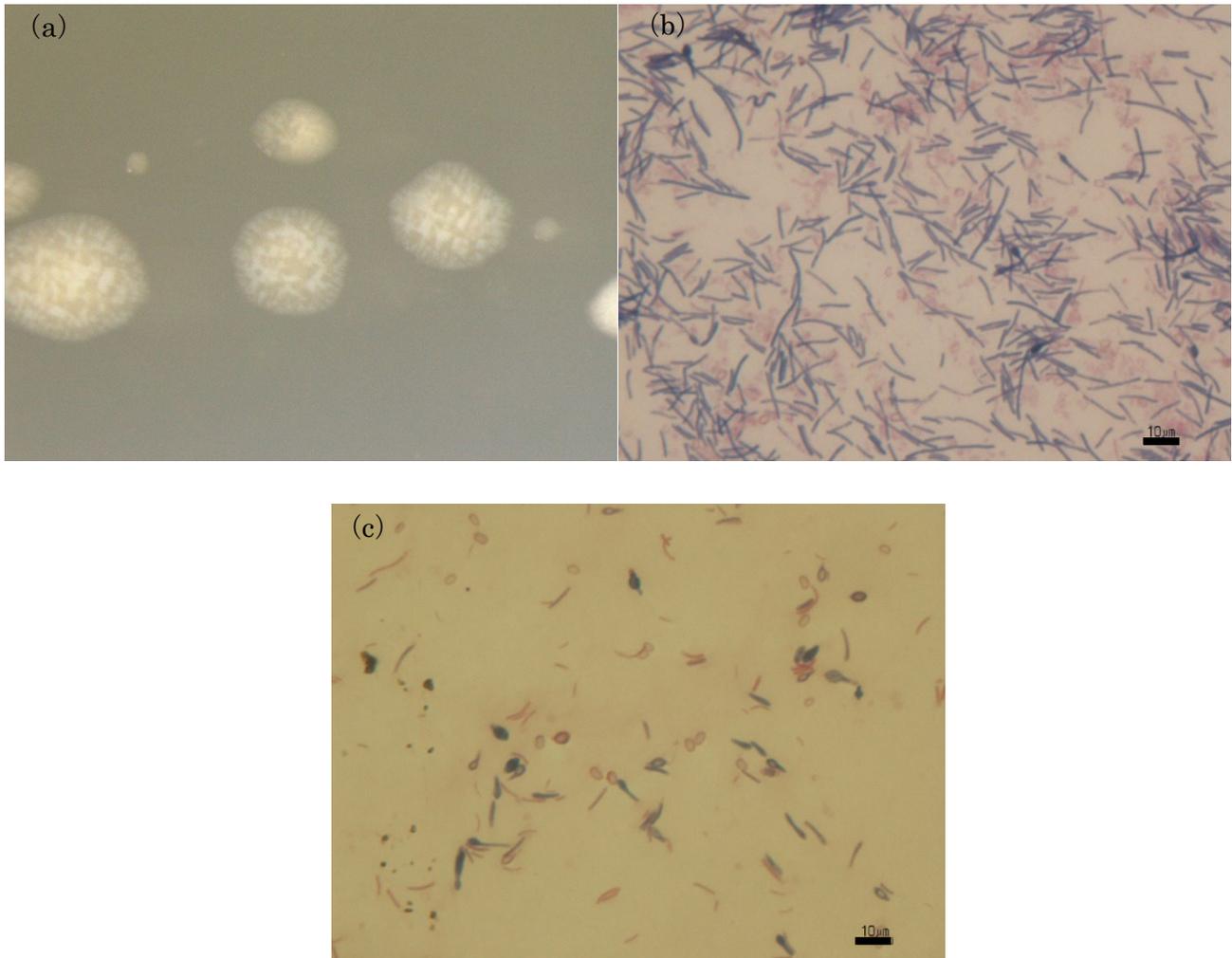


図 4-4. skT53 株の顕微鏡写真

コロニー像 (a)、グラム染色像 (b)、芽胞像 (c) の結果を示す。バーは 10 μm を示す。

4.4.4. 嫌気条件下の生育

嫌気条件下での生育を確認した。好気条件の生育と比較したところ、生育はしているが、好気条件より弱い生育と判明した。

4.4.5. 至適温度、至適 pH

50、52、54、55 $^{\circ}\text{C}$ で得られた結果を以下の図に示した (図 4-5)。

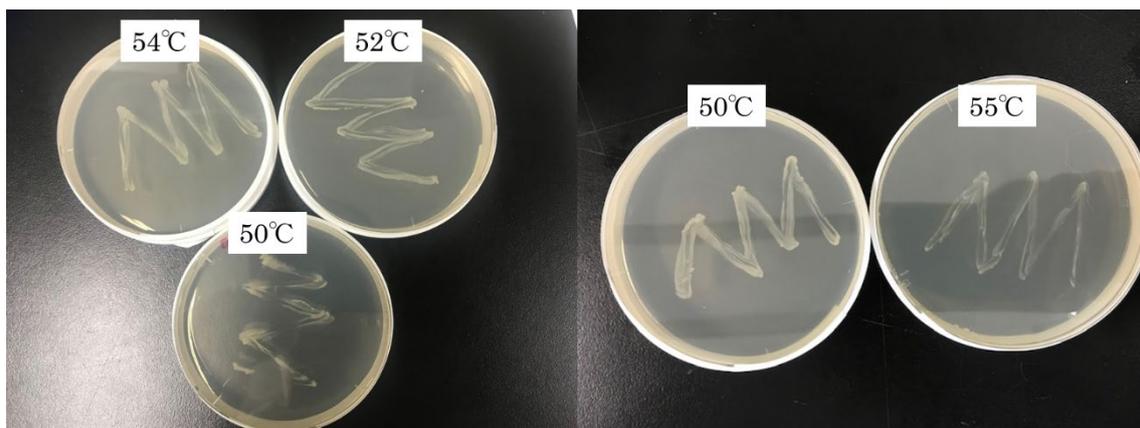


図 4-5. 50～55℃の skT53 株の生育

50、52、54、55℃では増殖し植菌した線がはっきりと確認できた。60、80℃では生育を確認できなかった。

35、37、40、41、44℃の培養結果を以下のグラフに示した（図 4-6）。

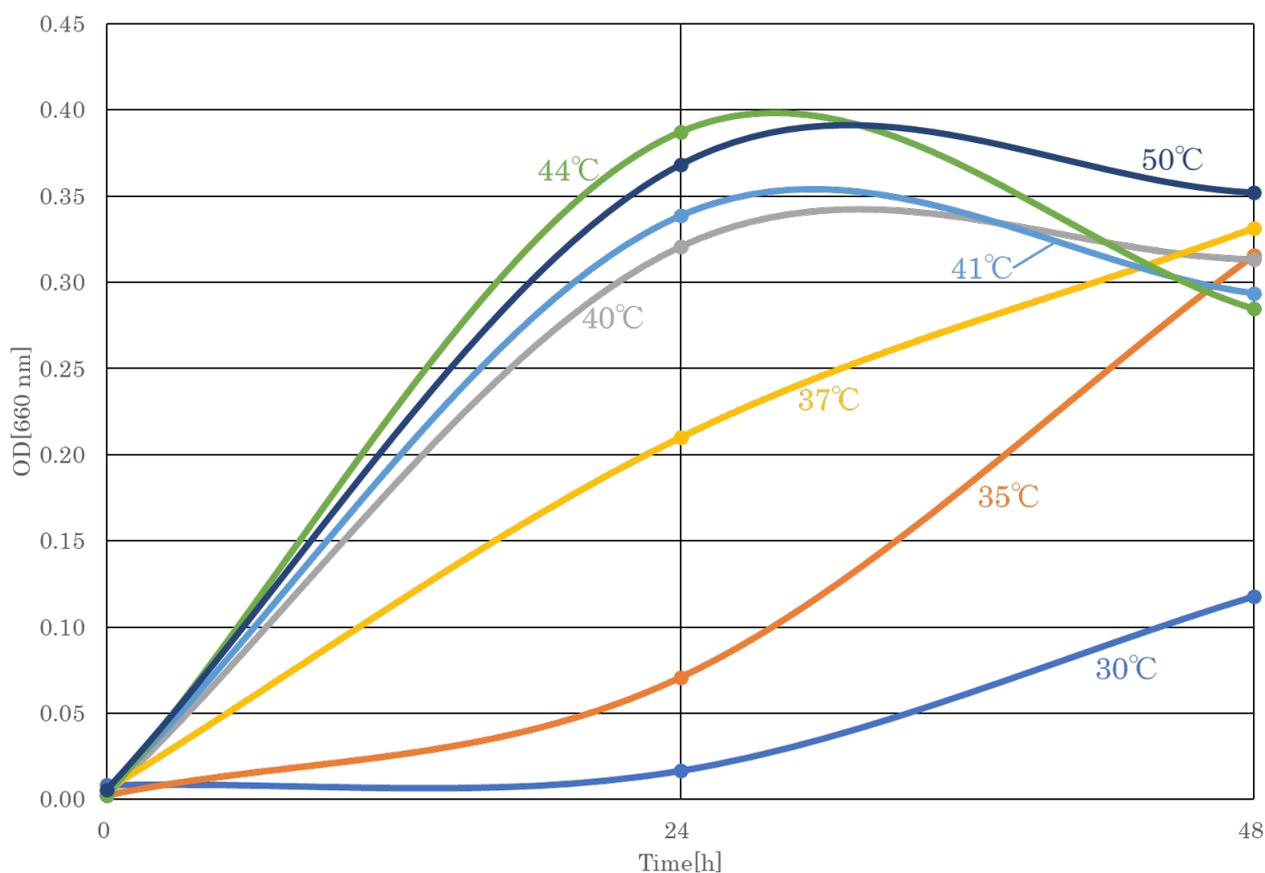


図 4-6. skT53 株の温度による生育の変化

縦軸は OD[660 nm]、横軸は培養時間を示した。

30、35℃では生育が遅く 1 日目では生育ピークに達しなかった。41、44、45、50℃で

は1日目で生育がピークに達していた。41℃は44℃に比べ生育が低いことから、至適温度は44℃～55℃とした。

4.4.6. API50CH を用いた炭水化物代謝試験

酸化試験及び同化試験の試験結果を以下の表に示した（表 4-4）。

表 4-4. API50CH の試験項目及び結果

基質成分	反応	基質成分	反応	基質成分	反応
Glycerol	—	D-Mannitol	—	D-Raffinose	—
Erythritol	—	D-Sorbitol	—	Starch	—
D-Arabinose	—	Methyl- α -D-Mannopyranoside	—	Glycogen	—
L-Arabinose	—	Methyl- α -D-Glucopyranoside	—	Xylitol	—
D-Ribose	—	N-Acetylglucosamine	—	Gentiobiose	—
D-Xylose	—	Amygdalin	—	D-Turanose	—
L-Xylose	—	Arbutin	—	D-Lyxose	—
D-Adonitol	—	Esculin-ferric-citrate	—	D-Tagatose	—
Methyl- β -D-Xylopyranoside	—	Salicin	—	D-Fucose	—
D-Galactose	—	D-Cellobiose	—	L-Fucose	—
D-Glucose	—	D-Maltose	—	D-Arabitol	—
D-Fructose	—	D-Lactose	—	L-Arabitol	—
D-Mannose	—	D-Melibiose	—	Gluconate	—
L-Sorbose	—	D-Sucrose	—	2-Ketogluconate	—
L-Rhamnose	—	D-Trehalose	—	5-Ketogluconate	—
Dulcitol	—	Inulin	—		
Inositol	—	D-Melezitose	—		

炭水化物代謝反応が陽性的の場合+、陰性的の場合-で示した。

4.4.7. 炭素源の資化性試験

糖の資化性試験と有機酸の資化性試験では Control として YEM 培地で培養行った。13 種の糖の資化性試験の結果をグラフで示した (図 4-7)。

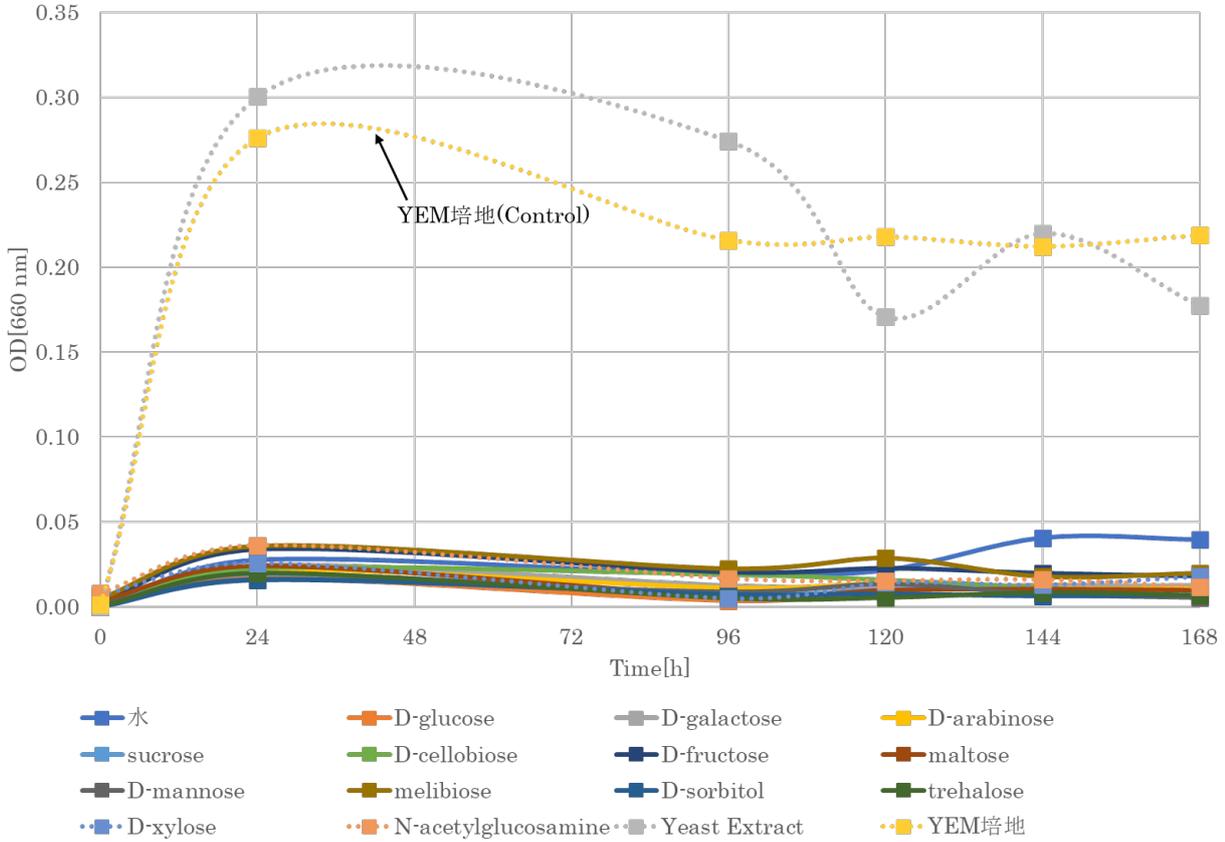


図 4-7. 糖の資化性試験の結果

縦軸は OD[660 nm]、横軸は培養時間を示す。3 回培養を行い、平均を結果に示した。

Yeast Extract の生育は確認できたが、13 種の糖全てで生育が確認できなかった。今回使用した糖全てで資化能がないことが判明した。

続いて、有機酸の資化性試験の結果をグラフで示した (図 4-8)。

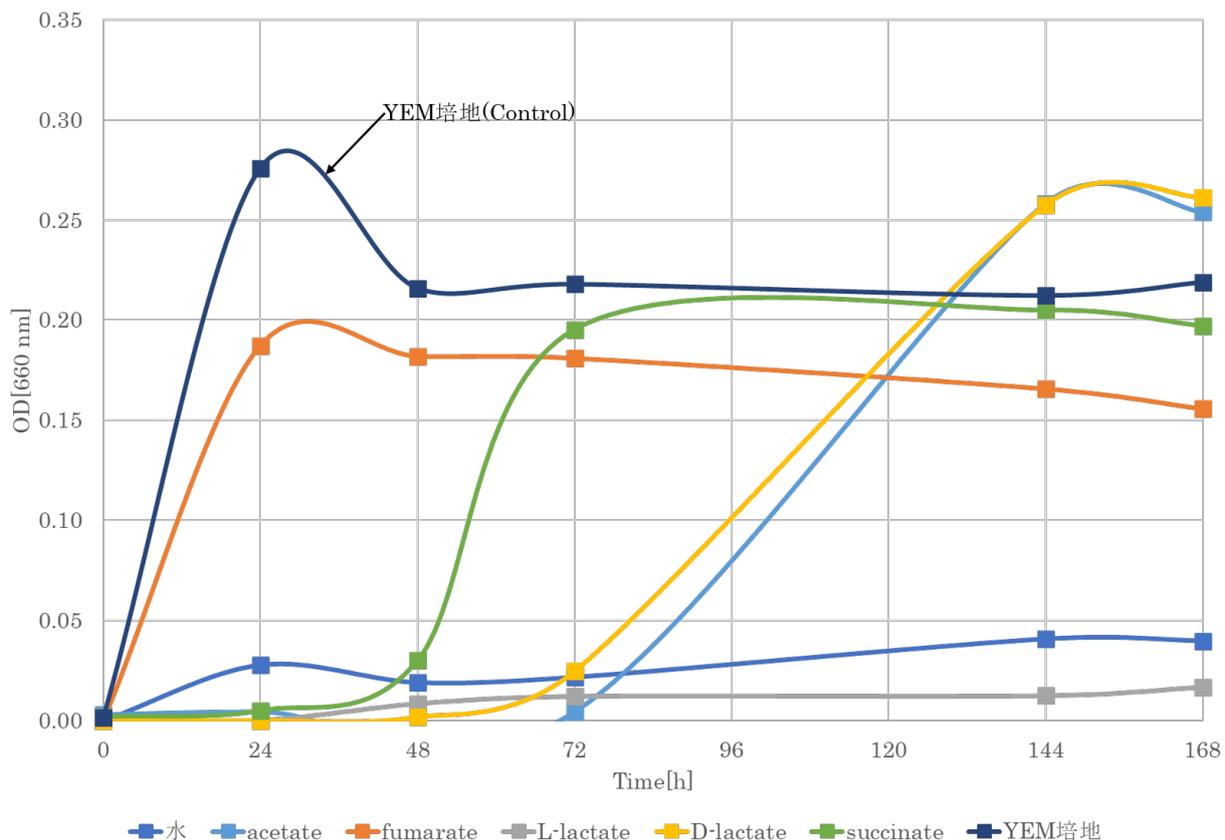


図 4-8. 有機酸の資化性試験

縦軸は OD[660 nm]、横軸は培養時間を示す。3 回培養を行い、平均を結果に示した。

acetate、fumarate、D-lactate、succinate で生育が確認できた。この 4 つの有機酸において資化能があることが判明した。

4.4.8. 酵素活性試験

skT53 株の酵素活性試験を 3 回行った。APIZYM の結果は、図のように確認できる (図 4-9)。



図 4-9. skT53 株の酵素活性試験の様子

陽性の場合には色が変わり、陰性の場合には変わらない。

酵素活性試験の結果を以下の表にまとめた (表 4-5)。

表 4-5. 酵素活性試験項目とその結果

酵素	反応	酵素	反応
Control		酸性フォスファターゼ	+
アルカリフォスファターゼ	+	ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドラーゼ	+
エステラーゼ(C4)	+	α -ガラクトシダーゼ	-
エステラーゼリパーゼ(C8)	+	β -ガラクトシダーゼ	-
リパーゼ(C14)	-	β -グルクロニダーゼ	-
ロイシンアリルアミダーゼ	+	α -グルコシダーゼ	-
バリンアリルアミダーゼ	+	β -グルコシダーゼ	-
シスチンアリルアミダーゼ	-	N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	-
トリプシン	-	α -マンノシダーゼ	-
α -キモトリプシン	-	α -フコシダーゼ	-

陽性の場合+、陰性の場合-で示した。

19 の酵素の内アルカリフォスファターゼ、エステラーゼ (C4)、エステラーゼリパーゼ (C8)、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性フォスファターゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドラーゼの 6 つの酵素活性が確認した。

4.4.9. 脂肪酸およびキノン分析

脂肪酸分析の結果、主要な細胞脂肪酸（全体の 10%以上）は anteiso-C15:0（18.26%）、iso-C15:0（17.40%）、iso-C16:0（15.36%）であった。全細胞脂肪酸の割合を表に示した（表 4-6）。

表 4-6. skT53 株の全細胞脂肪酸分析結果

Fatty acid	skT53 株[%]	Fatty acid	skT53 株[%]
iso-C _{13:0}	0.52	iso-C _{17:0} ω9c	-
iso-C _{14:0}	7.99	anteiso-C _{17:0}	2.36
C _{14:0}	0.63	C _{17:1} ω6c	0.56
iso-C _{15:0}	20.14	C _{17:0}	8.05
anteiso-C _{15:0}	25.85	iso-C _{18:1} H	-
C _{15:0}	-	iso-C _{18:0}	0.46
C _{15:1} ω6c	0.38	C _{18:0}	0.63
iso-C _{16:1} H	0.38	C _{18:1} 2OH	0.46
iso-C _{16:0}	17.95	Summed Features*	
C _{16:1} ω5c	-	Sum In Feature 3	0.42
C _{16:0}	7.00	Sum In Feature 4	0.92
iso-C _{17:0}	5.31		

Summed feature 3は C_{16:1} ω7c / C_{16:1} ω6c からなる。

Summed feature 4は C_{17:1} iso I / anteiso B からなる。

キノンは、MK-7 (97.5%) と MK-8 (2.4%) であった。

極性脂質は、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルメチリエタノールアミン、未同定のリン脂質 3 種、未同定の極性脂質 2 種であった。

ペプチドグリカンには、アラニン、グルタミン酸、メソ-ジアミノピメリン酸が含まれていた。

4.4.10. 全ゲノム配列解析、G+C 含量

全ゲノム配列の結果は平均サブリード長 9,597、サブリード合計 141,865、N50、14,408 塩基、サブリード合計塩基数 1,362Mb であった。アッセムブリの完全性は 98.7% であった。ゲノムは 1 つの環状 DNA であることはオーバーラップによって確認した。全ゲノムの長さは 3,454,394 bp、G+C 含量は 48.22 mol% であった。ゲノム配列のアノテーションの結果、3599 個のコーディング DNA 配列 (CDS)、27 個の rRNA、86 個の tRNA、1 個のトランスファーメッセンジャーRNA (tmRNA) が存在した。

アノテーションの結果、skT53 株には、亜硝酸酸化還元酵素や硝酸酸化還元酵素、同化的硝酸還元酵素と酸性フォスファターゼの遺伝子を有しているということが判明した。窒素循環に関わる酵素を図に示した (図 4-11)。

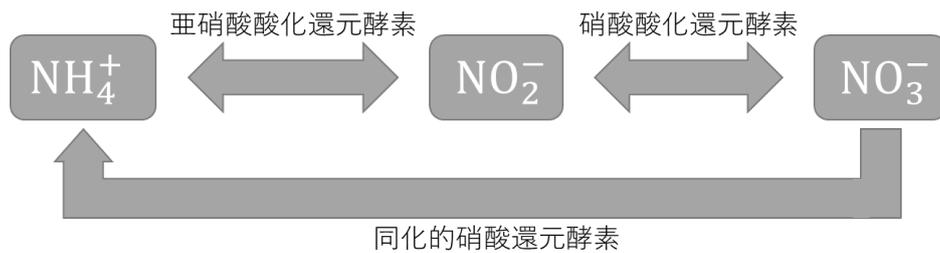


図 4-10. アノテーションで得られた窒素循環に関わる酵素

4.4.10.1. コンセンサス系統樹の作成

autoMLST 用いて *Alicyclobacillaceae* 科の各種と skT53 株の位置を図に示した (図 4-11)。コンセンサス系統樹より *Effusibacillus* 属のグループに属していた。

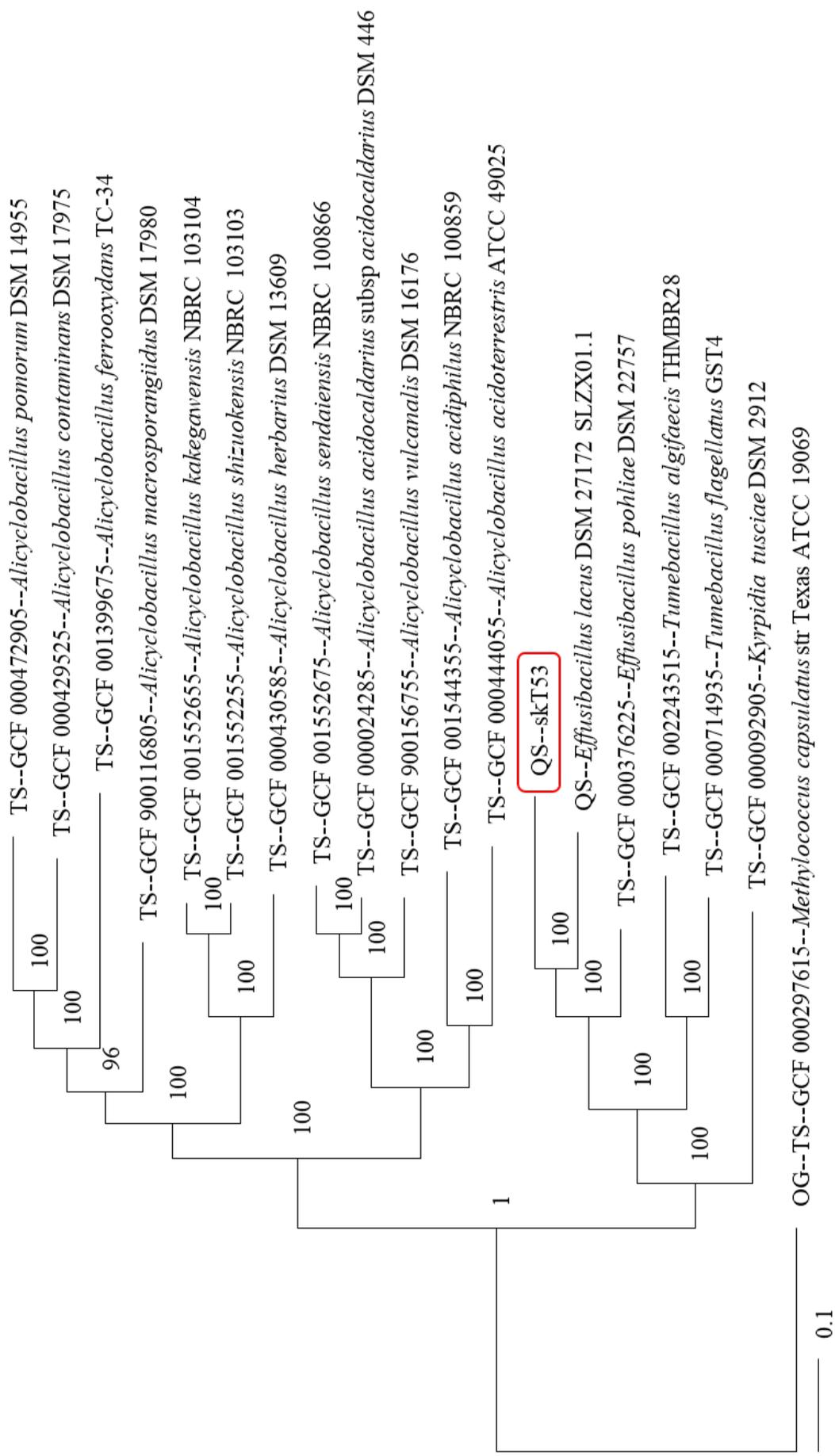


図 4-11. autoMLST を用いたコンセンサス系統樹
 Automated Multi-Locus Species Tree (autoMLST) (<https://automlst.ziemertlab.com>) を用いて、skT53T 株のコア遺伝子と NCBI Assembly データベースに登録されている *Alicyclobacillaceae* 科の種とのマルチローカス・アラライメントから構築した。

4.4.10.2. ANI 法及び dDDH 法を用いた菌の同定

E. pohliae DSM 22757^T と *E. lacus* DSM 27172^T の 2 株で同種異種の判定を行った。ANI 値では、*E. pohliae* DSM 22757^T に対して 72.0%、*E. lacus* DSM 27172^T に対して 71.8%を示し、dDDH 値では、*E. pohliae* DSM 22757^T に対して 18.8%、*E. lacus* DSM 27172^T に対して 22.5%を示した。このことから、skT53 株は *Effusibacillus* 属の新種と判定した。

4.4.11. skT53 株を接種した土壌でのコマツナ生育試験

skT53 株を接種した土壌と未接種の土壌でのコマツナの生育を試験した。測定項目は、葉の枚数、最大の大きさの葉について、コマツナ全体の乾燥重量について測定した。測定した結果を表にして示した（表 4-7、表 4-8）。

表 4-7. skT53 株を接種区でのコマツナの生育

	葉数 (枚)	最大本葉 (cm)			乾燥重量 (mg)
		長さ	幅	茎長	
プランター1	6	5.5	3.2	4.1	101.6
	5	3.5	2.5	3.0	35.1
	7	6.8	4.0	4.6	136.8
プランター2	8	8.8	5.3	4.8	277.4
	7	6.5	4.7	4.2	224.3
プランター3	6	5.1	3.5	4.1	134.6
	6	4.2	3.6	3.4	104.6
	7	6.9	5.3	4.2	306.7
プランター4	8	7.4	5.3	4.4	362.0
	7	7.0	5.4	4.7	325.2
	7	6.3	4.5	4.8	185.3
プランター5	7	7.0	5.0	5.0	217.3
	7	8.3	6.0	5.2	551.2
プランター6	5	4.3	3.3	3.7	58.0
	6	3.8	2.7	2.6	35.6
	5	3.7	2.2	2.3	24.8
プランター7	6	7.5	4.1	4.7	201.8
	7	7.2	5.5	4.4	260.6
	7	7.2	5.2	5.7	331.3
プランター8	6	5.0	3.6	3.4	88.4
	6	3.9	2.3	2.5	51.9
	5	4.7	3.4	3.4	65.2
平均	6.4	5.9	4.1	4.1	185.4
				重量 100 mg 以上	15 株/22 株

表 4-8. skT53 株を未接種区でのコマツナの生育

	葉数 (枚)	最大本葉 (cm)			乾燥重量 (mg)
		長さ	幅	茎長	
プランター1	6	5.5	4.5	4.1	198.8
	5	3.5	2.8	2.9	54.1
	6	3.8	2.8	2.9	53.3
プランター2	6	5.0	3.3	3.9	98.9
	5	4.0	2.5	3.1	44.2
	6	4.5	2.6	3.5	74.2
プランター3	8	7.2	5.1	4.2	229.0
	7	6.9	5.1	4.6	301.7
	8	6.7	4.9	4.1	304.3
プランター4	7	7.9	5.6	4.7	409.6
	8	6.6	4.5	3.5	275.3
	6	4.2	2.9	2.9	67.1
プランター5	4	3.8	2.3	2.2	16.9
	5	4.1	2.3	2.3	30.1
プランター6	5	3.1	2.2	2.7	34.3
	6	5.7	4.6	4.3	146.6
	6	4.2	3.2	3.1	91.7
プランター7	6	4.1	3.6	3.4	118.6
	5	5.2	3.1	3.0	64.6
	7	6.8	4.5	4.1	246.5
プランター8	6	6.6	4.8	4.8	147.6
	7	6.5	5.0	3.5	226.5
	6	6.0	4.7	4.0	202.3
平均	6.1	5.3	3.8	3.6	149.4
重量 100 mg 以上					12 株/23 株

生育測定の結果、接種条件の土壌で葉数、長さ、幅、茎長、乾燥重量で平均値が高かった。また、乾燥重量が 100 mg 以上のものを生育良好とした。生育良好は接種条件の土壌で 22 株中 15 株、非接種条件の土壌で 23 株中 12 株となり接種している土壌の方で生育不良が少ない。これらの結果から skT53 株が作物へ良い影響を与えている可能性がある。

t 検定を行った結果 (表 4-9)、茎長では有意差ありとなり、それ以外では有意差なしとなっている。これは、作物の個体差が原因であると考えられる。

表 4-9. skT53 株の接種がコマツナの生育に与える影響

	葉数 (枚)	最大本葉 (cm)			乾燥重量 (mg)
		長さ	幅	茎長	
未接種土壌	6.1	5.3	3.8	3.6	149.4
接種土壌	6.4	5.9	4.1	4.1	185.4
t 検定	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

*は 5% で有意差あり、n.s. は有意差なし

4.5. まとめ

この分離株の特徴は、通性嫌気性のグラム陽性菌で、芽胞を形成し、細胞サイズは 0.6 ~ 0.8 × 2 ~ 10 μm の棒状である。生育可能な温度範囲は 35 ~ 55°C で、最適な生育温度は 44 ~ 55°C。生育可能な pH 範囲は 4.0 ~ 6.0 で、最適な pH は 5.0 でした。オキシダーゼ活性は陽性だが、カタラーゼ活性は陰性であった。炭素源として Yeast Extract、acetate、fumarate、D-lactate、succinate などを利用する。主な脂肪酸は、anteiso-C15:0、iso-C15:0、iso-C16:0 である。主なキノンは MK-7 である。極性脂質は、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルメチルエタノールアミン、3 つの未同定のリン脂質、2 つの未同定の極性脂質からなる。細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸はメソ DAP である。ゲノム DNA の G+C 含量は 48.2mol% である。系統樹から skT53 株は *Effusibacillus* 属に属する微生物であることから、*Alicyclobacillaceae* 科に属する種との特徴の違いを表にまとめた (表 4-10)。

全ゲノム配列解析の結果、全ゲノム配列の長さは 3,454,394 bp、G+C 含量は 48.22 mol% であった。アノテーションの結果、3599 個のコーディング DNA 配列 (CDS)、27 個の rRNA、86 個の tRNA、1 個のトランスファーメッセンジャー RNA (tmRNA) が存在した。skT53 株には、亜硝酸酸化還元酵素や硝酸酸化還元酵素、同化的硝酸還元酵素と酸性ホスファターゼの遺伝子を有しているということが判明した。

skT53 株のゲノム配列は国際塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) に登録した (アクセッション番号: AP023366)。決定した skT53 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は国際塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) に登録した (アクセッション番号: LC586281)。skT53 株を NITE バイオテクノロジーセンターとタイ遺伝子工学バイオテクノロジーセンターに寄託した (寄託番号 NBRC 114101^T および TBRC 11241^T)。

表 4-10. skT53 株と *Alicyclobacillaceae* 科に属する種との特徴の違い

Strains: 1, skT53^T; 2, *Effusibacillus lacus* skLN1^T; 3, *Effusibacillus consociatus* CCUG 53762^T; 4, *Effusibacillus pohliae* CIP 109385^T; 5, *Alicyclobacillus acidocaldarius* 104-1A^T; 6, *Tumebacillus permanentifrigoris* Eur1 9.5^T Strains 2–6 のデータは Watanabe ら (2014) から取得した。

+, 生育; -, 生育しない; w, 弱い生育; s, 若干の生育

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Anaerobic growth	w	+	-	+	-	-
Optimal growth temperature	44–55	50–52	30	55	60–65	25–30
pH range for growth	4.0–6.0	7.0–8.5	5.5–10.5	4.5–7.5	2.0–6.0	5.5–9.0
Oxidase/catalase	+/-	+/-	Weak/-	-/-	-/Weak	-/-
DNA G+C content (mol%)	48.2	50.8	47	55.1	60.3	53.1
Major fatty acids	anteiso-C _{15:0} , iso-C _{15:0} , iso-C _{15:0} , iso-C _{16:0}	iso-C _{14:0} , iso-C _{15:0} , iso-C _{16:0}	iso-C _{15:0} , anteiso-C _{15:0}	iso-C _{15:0} , iso-C _{16:0} , iso-C _{17:0}	ω-cyclohexane-C _{17:0} , ω-cyclohexane-C _{19:0}	iso-C _{15:0}
Aerobic growth on:						
D-Glucose	-	+	+	+	+	+
D-Fructose	-	+	-	+	+	+
Cellobiose	-	+	-	+	+	+
Sucrose	-	-	+	+	+	s
Melibiose	-	-	-	+	+	s
N ⁻	-	+	+	+	-	s
Acetylglucosamine						

以下の表に得られた結果と論文で報告されている *Effusibacillus* 属の各種の脂肪酸について記載した (表 4-11)。

表 4-11. skT53 株の *Effusibacillus* 属の各種の全細胞脂肪酸分析

Strains: 1, skT53^T; 2, *Effusibacillus lacus* skLN1^T; 3, *Effusibacillus consociatus* CCUG 53762^T; 4, *Effusibacillus pohliae* CIP 109385^T

Strains 2-4 の株データは Watanabe ら (2014) と Glaeser ら (2013) から取得した。

- ; 検出無しもしくは、報告なし

Fatty acid	No.1	No.2	No.3	No.4
iso-C _{13:0}	0.52	-	-	-
iso-C _{14:0}	7.99	24.93	7.5	3.0
C _{14:0}	0.63	1.98	0.8	-
iso-C _{15:0}	20.14	14.93	12.9	39.4
anteiso-C _{15:0}	25.85	11.3	20.4	10.3
C _{15:0}	-	-	-	2.4
C _{15:1} ω6c	0.38	-	-	-
iso-C _{16:1} H	0.38	1.88	8.4	-
iso-C _{16:0}	17.95	36.31	-	14.0
C _{16:1} ω5c	-	-	1.5	-
C _{16:0}	7.00	5.86	3.9	2.7
iso-C _{17:0}	5.31	2.05	7.5	19.6
iso-C _{17:0} ω9c	-	-	0.9	-
anteiso-C _{17:0}	2.36	0.76	2.7	6.2
C _{17:1} ω6c	0.56	-	-	-
C _{17:0}	8.05	-	-	-
iso-C _{18:1} H	-	-	1.9	-
iso-C _{18:0}	0.46	-	-	-
C _{18:0}	0.63	-	-	-
C _{18:1} 2OH	0.46	-	-	-
Summed Features*				
Sum In Feature 3	0.42	-	-	-
Sum In Feature 4	0.92	-	-	-

Summed feature 3 は C_{16:1} ω7c / C_{16:1} ω6c からなる。

Summed feature 4 は C_{17:1} iso I / anteiso B からなる。

以上のことから、skT53 株は *Effusibacillus* 属の新種であり、*E. dendaii* sp. nov. という名前を提案した。

第5章 結論

土壌の微生物叢解析と土壌の栄養素の測定から、生育不良の原因は窒素循環に関わる微生物が少ないことで、窒素が不足し生育不良が起きた可能性が示唆された。必要な栄養素が適正值以下でも作物が生育良好の場合がある。この理由のひとつは栄養素を供給する物質循環に関わる微生物が多く存在した場合、不足する栄養素が物質循環により供給されていることと考えられた。また、畑土壌中には未培養な系統分類群や機能が解明されていない微生物が作物の生育に影響を与えている可能性も示唆された。

生育不良土壌をくん蒸剤を用いて土壌消毒を行った後、作物の生育が回復していたことから、微生物が生育に影響を与えているなど微生物による未知の影響が作物の生育に対してあるとの仮説を立て、生育不良土壌から微生物の単離を行い、9株の候補株を取得した。その中から *Hyphomicrobium* 属の N39 株と *Alicyclobacillaceae* 科の N53 株の存在割合は土壌消毒後の土壌で生育不良土壌よりが高くなった。その後、8ヶ月後の土壌や1年後の土壌で高くなっていることから作物に良い影響を与える可能性が示唆された。この N39 株と N53 株に注目しそれぞれ skT39 株と skT53 株と名付けた。skT39 株はその後の培養が上手くいかなかったため、skT53 株についてどのような特性を持ち、植物にどのような影響を与えるか調べた。

単離した skT53 株は 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析から *Effusibacillus* 属に属する微生物であることが判明した。skT53 株と *Alicyclobacillaceae* 科に属する種の特徴と ANI 値や dDDH 値を比較したところ skT53 株は *Effusibacillus* 属の新種であることが明らかになり、*E. dendaii* という学名を提案した。本微生物のゲノムの長さは 3,454,394 bp、G+C 含量は 48.22 mol%であった。ゲノム配列のアノテーションの結果、3599 個のコーディング DNA 配列(CDS)、27 個の rRNA、86 個の tRNA、1 個のトランスファーメッセンジャーRNA(tmRNA)が示された。skT53 株には、亜硝酸酸化還元酵素や硝酸酸化還元酵素、同化的硝酸還元酵素と酸性フォスファターゼの遺伝子を有しているということが判明した。コマツナ生育試験を行った結果、skT53 株が作物へ良い影響を与えている可能性が示唆された。

第6章 参考文献

- 杉山修一 (2017) 奇跡のリンゴのマイクロバイーム研究から見えてきたこと 科学技術未来戦略ワークショップ報告書植物と微生物叢の相互作用の研究開発戦略-理解・応用・制御に向けて-, pp.39-42、国立研究開発法人科学技術振興機構研究開発戦略センター
- 津田新哉 (2006) 土壌伝染性ウイルス病対策技術開発への取り組み 野菜茶業研究集報 第3号、pp. 29-34、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所.
- 日本土壌微生物学会 (1997) 新・土の微生物 (2)、博友社.
- 日本土壌微生物学会 (2000) 新・土の微生物 (5)、博友社.
- 日本土壌協会 (2014) 土・肥料のきほん、誠文堂新光社.
- 中川恭好、川崎浩子 (2001) 遺伝子解析法 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法 放線菌の分類と同定、pp.88-117、日本放線菌学会 編、日本学会事務センター.
- 藤田祐、飯村強、郷内武、小田部祐、遠藤佳那子ほか (2015) I. 土壌分析法 改訂版 土壌・作物栄養診断マニュアル ver.3、茨城県農業総合センター.
- 横山和成 (2015) 土壌微生物のきほん、誠文堂新光社.
- 堀江武 (2015) 農業のきほん、誠文堂新光社.
- 服部勉、宮下清貴、齋藤明広 (2008) 改訂版 土の微生物学、養賢堂.
- Alanjary M, Steinke K, Ziemert N (2019) AutoMLST: an automated web server for generating multi-locus species trees highlighting natural product potential. *Nuc Acids Res* 47: W276-W282.
- Auch AF, von Jan M, Klenk HP, Göker M (2010) Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* 2:117-134.
- Barrow GI, Feltham RKA (1993) *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. Cambridge: University Press
- Bonjour F, Aragno M (1984) *Bacillus tusciae*, a new species of thermoacidophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. *Arch Microbiol* 139: 397- 401.
- Brian GF, Jeff FH, Kochian L (2004) Focus on plant nutrition. *Plant Physiology* 136: 2437-2576.
- Broadley MR, White PJ (2005) *Plant nutritional genomics*. Blackwell
- Collins MD, Pirouz, T, Goodfellow M, Minnikin, DE (1977) Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 100: 221-230.
- da Costa MS, Rainey FA (2009) Family II. *Alicyclobacillaceae* fam. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 3, p. 229. Edited by P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer & W. B. Whitman. New York: Springer

- Delaney ML, Onderdonk AB (1997) Evaluation of the AnaeroPack system for growth of clinically significant anaerobes. *J Clin Microbiol* 35: 558-62.
- Epstein E, Bloom AJ (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives second edition Sinauer Associates
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368–376.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20: 406–416.
- Glaeser SP, Falsen E, Martin K, Kämpfer P (2013) *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 3623–3627.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P et al. (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 81–91.
- Hamada M, Yamamura H, Komukai C, Tamura T, Suzuki K et al. (2012) *Luteimicrobium album* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a lichen collected in Japan, and emended description of the genus *Luteimicrobium*. *J Antibiot* 65: 427–431.
- Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S (1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 29: 319-322.
- Imperio T, Viti C, Marri L (2008) *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica) . *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 221–225.
- Janssen PH, Yates PS, Grinton YB, Taylor PM, Sait M (2002) Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* 68: 2391–2396.
- Kathpalia R, Bhatla SC (2018) Plant Mineral Nutrition. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore.
- Klenk HP, Lapidus A, Chertkov O, Copeland A, Del Rio TG et al. (2011) Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. and emendation of the family *Alicyclobacillaceae* da Costa and Rainey, 2010. *Stand Genomic Sci* 5: 121–134.
- Kroppenstedt RM (1982) Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP 18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *J Liquid Chromatogr* 5: 2359–2387.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular

- Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rDNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, J. Wiley & Sons, Chichester, England. pp. 115–175
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6955–6959.
- Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H et al. (2002) Oligonucleotide microarray for 16s rRNA gene - based detection of all recognized lineages of sulfate - reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 68: 5064–5081.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M (2013a) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14: 60.
- Meier-Kolthoff JP, Göker M, Spröer C, Klenk HP (2013b) When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch Microbiol* 195: 413–418.
- Minnikin DE, Collins MD, Goodfellow M (1979) Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J Appl Bacteriol* 47: 87–95.
- Reiner JE, Jung T, Lapp CJ, Siedler M, Bunk B et al. (2018) *Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at Sao Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 68: 3735-3740.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Sakamoto M, Iino T, Ohkuma M (2017) *Faecalimonas umbilicata* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, and reclassification of *Eubacterium contortum*, *Eubacterium fissicatena* and *Clostridium oroticum* as *Faecalicatena contorta* gen. nov., comb. nov., *Faecalicatena fissicatena* comb. nov. and *Faecalicatena orotica* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1219-1227.
- Sasser M (1990) *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*. Newark, DE: MIDI Inc.
- Simao FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210–3212.
- Steven B, Chen MQ, Greer CW, Whyte LG, Niederberger TD (2008) *Tumebacillus permanentifrigoris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, spore-forming bacterium isolated

- from Canadian high Arctic permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1497–1501.
- Tamaki H, Hanada S, Sekiguchi Y, Tanaka Y, Kamagata Y (2009) Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ Microbiol* 11: 1827–1834.
- Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N et al. (2005) Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl Environ Microbiol* 71: 2162–2169.
- Tanizawa Y, Fujisawa T, Nakamura Y (2018) DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34:1037–1039.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
- Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 46: 327–338.
- Watanabe M, Kojima H, Fukui M (2014) Proposal of *Effusibacillus lacus* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Alicyclobacillus pohliae* as *Effusibacillus pohliae* comb. nov. and *Alicyclobacillus consociatus* as *Effusibacillus consociatus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 2770-2774.
- Wani SA, Chand S, Ali T (2013) Potential Use of *Azotobacter Chroococcum* in Crop Production: An Overview. *Curr Agri Res* 1: 35-38.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O et al. (1987) Report of the AD hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 37: 463–464.
- Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, 2nd edn, vol. 4, pp. 3352–3378. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer
- Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr, Fox GE, Deinhard G, Poralla K (1992) Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 263–269.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y et al. (2017a) Introducing EzBioCloud: a taxonomically United database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 1613–1617.
- Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S, Chun J (2017b) A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1281-1286.

第7章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻をいただきました松田七三男教授と東京大学大学院農学研究科微生物膜輸送工学の川崎寿特任教授に心から感謝申し上げます。また、研究を手伝ってくださった応用生命工学研究室の坂井沙織さん、飛田徹さんに心から感謝申し上げます。

脂肪酸およびキノン分析、系統樹の作成、ANI法とdDDH法を用いた菌の同定を行うにあたり、多大なるご協力を頂きました独立行政法人製品評価技術基盤機構の田村朋彦さんに深く感謝申し上げます。また、コマツナ生育試験を行うにあたり土壌や栽培の助言を頂きました東京都農林総合研究センター江戸川分場の吉岡孝行さんに深く感謝申し上げます。

実験のサンプルとして作物を栽培した土壌をくださった足立区の協力農家の方々に心から感謝致します。

東京電機大学工学部環境化学科応用生命工学研究室の皆様と実験を行うことができ、様々な方々に協力いただきました。ご協力いただいた皆様に心よりお礼を申し上げます。